

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno- matematički fakultet
Biološki odsjek

Josipa Dragun

**Učinkovitost galne kiseline na angiogenezu,
oksidativni stres i rast tumora**

Diplomski rad

Zagreb, 2016

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Nade Oršolić, red. prof. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINKOVITOST GALNE KISELINE NA ANGIOGENEZU, OKSIDATIVNI STRES I RAST TUMORA

Josipa Dragun

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Formiranje tumora je proces koji uključuje akumuliranje genetskih i epigenetskih promjena i vodi do progresivne transformacije normalnih, zdravih stanica u maligne. Tumorske stanice posjeduju određene sposobnosti nepoznate normalnim stanicama: otpornost na inhibiciju rasta, proliferiraju bez ovisnosti o faktorima rasta, neograničeno se repliciraju, izbjegavaju apoptozu, invadiraju i metastaziraju te podupiru angiogenezu. Razvoj tumorske bolesti usko je povezan i s utjecajem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) na brojne stanične funkcije. U radu smo istražili utjecaj galne kiseline (GA) na oksidacijski stres, rast tumora i angiogenezu u miševa nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT). EAT stanice ($2,5 \times 10^6$) injicirane su intraperitonealno (*ip*) u Swiss albino miševe. Nakon inokulacije tumora, miševi su injicirani *ip* s GA u koncentraciji od 40 i 80 mg/kg tjelesne težine u fazi eksponencijalnog rasta od 5 dana nakon injiciranja stanica tumora peti, sedmi i deveti dan i jedanaesti dan. Ukupni broj stanica ascitesa u peritonealnoj šupljini, diferencijalnu analizu stanica prisutnih u peritonealnoj šupljini, volumen ascitesa, funkcionalnu sposobnost makrofaga te druge protutumorske karakteriste GA analizirali smo 13-ti dan. Rezultatima je pokazano da je GA inhibirala rast EAT stanica i nastanak ascitesa u peritonealnoj šupljini miševa nositelja EAT. Antiangiogeni potencijal GA *in vivo* pokazan je kroz rezultate smanjene peritonealne angiogeneze i mikrožilne gustoće. Nadalje, GA je smanjila razinu NO u stanicama EAT, ali je povećala razinu NO u peritonealnim makrofagima. Razina arginaze 1 bila je snižena što ukazuje da je spriječena polarizacija u M2 makrofage. Na osnovu dobivenih rezultata možemo zaključiti da GA može aktivirati makrofage i povećati njihovo citotoksično djelovanje kroz povećanu proizvodnju NO, te spriječiti rast tumora i angiogenezu.

(90 stranica, 26 slika, 7 tablica, 39 literarna navoda, izvorni jezik: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: ROS, VEGF, NO, MDA, CAT, SOD, GSH, makrofagi

Voditelj: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Nada Oršolić

doc. dr. sc. Jasna Lajtner.

izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

THE EFFICIENCY OF GALLIC ACID ON ANGIOGENESIS, OXIDATIVE STRESS AND TUMOR GROWTH

Josipa Dragun

Roosveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Tumor formation is a process that involves accumulation of genetic and epigenetic changes leading to the progressive transformation of normal, healthy cells into malignant. Tumor cells possess certain skills unknown to normal cells: survival, proliferation without dependence on growth factors, unlimited replication, avoidance of apoptosis, invasiveness, metastasis and angiogenesis. The development of tumorigenesis is closely associated with the influence of reactive oxygen species (ROS) at the variety of cellular functions. In the present study we investigated the effect of gallic acid on oxidative stress, tumor growth and angiogenesis in EAT-bearing mice. EAT cells (2.5×10^6) were implanted intraperitoneally (*ip*) in Swiss albino mice. After tumor inoculation, mice were injected *ip* with GA at dose of 40 and 80 mg/kg bw in exponential growth phase from the 5 days after tumor cell injection (on day 5, 7, 9, 11). On day 13, ascites volume, the total number of cells, differential count of the cells present in the peritoneal cavity, functional activity of macrophages, anti-angiogenic and antioxidant parameters were determined. Results show that GA inhibited the growth of EAT cells and the formation of ascites in the peritoneal cavity of EAT-bearing mice. Further, results on decrease in the peritoneal angiogenesis and microvessel density show the anti-angiogenic potential of GA *in vivo*. Gallic acid also decreased NO level in tumor cells whereas NO level was increased in peritoneal macrophages. Decreased level of Arginase 1 (ARG 1) indicate that polarization is prevented in M2 macrophages. Based on the results we can conclude that the GA can activate macrophages and increase their cytotoxic activity through increased production of NO and prevent tumor growth and angiogenesis.

(90 pages, 26 figures, 7 tables, 39 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: ROS, VEGF, NO, MDA, CAT, SOD, GSH, macrophages

Supervisor: Nada Oršolić, PhD, Full Professor.

Reviewers: Nada Oršolić, PhD, Full Professor

Jasna Lajtner, PhD, Assistant Professor

Sandra Radić Brkanac, PhD, Associate Professor

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD	12
1.1. OSOBITOSTI TUMORA	12
1.1.1. Stupnjevi progresije tumora	14
1.1.2. Metastaziranje	14
1.2. ANGIOGENEZA	16
1.2.1. Hipoksija kao posljedica angiogeneze	20
1.2.2. Hipoksija, HIF- 1 i VEGF	21
1.3. UPALA	25
1.4. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDANSI	28
1.4.1. Reaktivni kisikovi radikali (ROS)	30
1.4.2. Produkcija ROS-a preko fagocitozne NADPH oksidaze	33
1.4.3. Nuklearni faktor- kappa B (NF- kappaB) i ROS	34
1.4.4. Tumori i ROS	35
1.4.5. Uloga antioksidanasa	36
1.4.6. Dušikov oksid (NO)	37
1.5.POLIFENOLI	38
1.5.1. Galna kiselina	39
2. MATERIJALI I METODE	41
2.1. MATERIJALI	41
2.1.1. Tumorske stanice	41
2.1.2. Pokusne životinje	41
2.1.3. Galna kiselina	42
2.1.4. Otapalo	42
2.1.5. Kemikalije	42
2.1.6. Instrumenti	43
2.2.METODE	44
2.2.1. Praćenje promjena tjelesne težine	44
2.2.2. Obrada životinja	44

2.2.3.	Protutumorska učinkovitost galne kiseline	46
2.2.3.1.	<i>Praćenje preživljenja životinja</i>	46
2.2.3.2.	<i>Određivanje ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini</i>	46
2.2.3.3.	<i>Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine</i>	46
2.2.4.	Učinak galne kiseline na angiogenezu	47
2.2.4.1.	<i>Priprema histoloških preparata peritonejske ovojnice</i>	47
2.2.4.2.	<i>Kvantitativno mjerenje prožiljenosti</i>	47
2.2.5.	Polarizacija makrofaga slezene i makrofaga nazočnih u ascitesu	48
2.2.5.1.	<i>Priprema radnih otopina za analizu NO.....</i>	48
2.2.5.1.1.	<i>Izolacija i stimulacija makrofaga slezene s LPS-om</i>	48
2.2.5.1.2.	<i>Izolacija i stimulacija makrofaga ascitesa s LPS-om</i>	49
2.2.5.1.3.	<i>Izolacija makrofaga ascitesa bez stimulacije s LPS-om</i>	49
2.2.5.2.	<i>Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u</i>	50
2.2.6.	Određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga iz peritonealne tekućine	52
2.2.7.	Određivanje koncentracije parametara oksidacijskog stresa i antioksidativne zaštite	52
2.2.7.1.	<i>Izolacija i priprema tkiva</i>	52
2.2.7.2.	<i>Određivanje proteina metodom prema Lowry-u</i>	53
2.2.7.3.	<i>Mjerenje količine lipidne peroksidacije</i>	55
2.2.7.4.	<i>Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze</i>	57
2.2.7.5.	<i>Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa</i>	57
2.2.7.6.	<i>Mjerenje enzimatske aktivnosti superoksid dismutaze</i>	59
2.2.8.	Određivanje koncentracije arginaze u uzorcima	61
2.3.	Statistička obrada podataka	61
3.	REZULTATI	62
3.1.	Ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini	62
3.2.	Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine	63
3.3.	Ukupni volumen ascitesa u peritonealnoj tekućini	64
3.4.	Kvantitativno mjerenje prožiljenosti	65
3.5.	Mjerenja NO indirektnom metodom prema Griess-u	66
3.5.1.	Razina NO iz LPS-om stimuliranih makrofaga slezene	66

3.5.2. Razina NO iz LPS-om stimuliranih makrofaga ascitesa	67
3.5.3. Razina NO iz LPS-om nestimuliranih makrofaga ascitesa	68
3.5.4. Razina NO iz nadtaloga LPS-om nestimuliranih makrofaga ascitesa	69
3.5.5. Razina NO iz nadtaloga stanica tumora	70
3.6. Funkcionalna aktivnost makrofaga iz peritonealne tekućine	71
3.7. Rezultati mjerenja aktivnosti ARG 1	72
3.7.1. Određivanje aktivnosti ARG 1 u nadtalogu stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom	72
3.7.2. Određivanje aktivnosti ARG 1 u nadtalogu makrofaga ascitesa	73
3.7.3. Određivanje aktivnosti ARG 1 u LPS-om stimuliranim makrofagima ascitesa	74
3.7.4. Određivanje aktivnosti ARG 1 u LPS-om stimuliranim makrofagima slezene	75
3.8. Mjerenje količine lipidne peroksidacije (MDA)	76
3.9. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT)	77
3.10. Mjerenje koncentracije ukupnog glutaciona (GSH)	78
3.11. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	79
4. RASPRAVA	80
5. ZAKLJUČAK	85
6. LITERATURA	86
7. ŽIVOTOPIS	90

POPIS KRATICA:

AP -1 – proteinski aktivator 1 (engl. *Activator protein 1*)

Apaf- 1 – proteazni aktivirajući faktor apoptoze (engl. *Apoptotic protease activating factor- 1*)

ATP – adenzin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

Bcl-2 – B- stanični limfom 2 (engl. *B- cell lymphoma*)

Bcl- XL – B- stanični limfom XL (engl. *B- cell lymphoma XL*)

BH4 – tetrahidrobiopterin (engl. *Tetrahydrobiopterin*)

CAT – katalaza (engl. *Catalase*)

COX- 2 – cikloksigenaza 2 (engl. *Cyclooxygenase 2*)

DRs – receptori smrti (engl. *Death receptors*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxiribonucleic acid*)

DTNB – Ellmanov reagens (engl. *Ellman's reagent*)

EAT - Ehrlichov ascitesni tumor (engl. *Ehrlich ascites tumor*)

EGF – epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal growth factor*)

ET-1 – endotelin 1 (engl. *Endothelin 1*)

eNOS – endotelna dušik oksid sintaza (engl. *Endothelial nitric oxide synthase*)

GA – galna kiselina (engl. *Gallic acid*)

GPx – glutation peroksidaza (engl. *Glutathione peroxidase*)

GRx – glutation reduktaza (engl. *Glutathion reductase*)

GR – glutationreduktaza (engl. *Glutathione reductase*)

GSH – glutation (engl. *Glutathione*)

GS – TNB – kompleks glutationa s 5- tionitrobenzoičnom kiselinom (engl. *glutathione adduct of GSH*)

H₂O₂ – vodikov peroksid (engl. *Hydrogen peroxide*)

HIF -1 – inducibilni faktor hipoksije 1 (engl. *Hypoxia inducible factor*)

HIF -1 alpha – inducibilni faktor hipoksije 1 alpfa (engl. *Hypoxia inducible factor 1 alpha*)

HIF -1 beta – inducibilni faktor hipoksije 1 beta (engl. *Hypoxia inducible factor 1 beta*)

HO- 1 – hem oksigenaza 1 (engl. *Hem oxygenase 1*)

HOCl – hipokloritna kiselina (engl. *Hypochlorous acid*)

HNO₂ – nitritna kiselina (engl. *Nitrous acid*)

IkB- alpha – inhibitorni nuklearni faktor kappa B alfa (eng. *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*)

IL-2 – interleukin 2 (engl. *Interleukin 2*)

iNOS – inducibilna dušik oksid sintaza (engl. *Inducible nitric oxide synthase*)

LOO- – alkilperoksil radikal (engl. *Alkylperoxyl radical*)

LOOH- lipohidroperoksid (engl. *Lipohydroxy peroxide*)

MAP – mitogen aktivirane proteinske kinaze (engl. *Mitogen- activated protein kinases*)

MDA – malondialdehid (engl. *Malonedialdehyde*)

MDA-(TBA)₂ – kompleks malondialdehida i tiobarbituratne kiseline (engl. *Complex malondialdehyde with 2-thiobarbituric acid*)

MMPs – matriks metaloproteinaze (engl. *Matrix metalloproteinse*)

MMP- 2 – matriks metaloproteinaza 2 (engl. *Matrix metalloproteinase 2*)

MPK – mitogen aktivirane protein kinaze (engl. *Mitogen activated protein kinase*)

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *Messenger Ribonucleic acid*)

N₂O₃ – dinitrogen trioksid (engl. *Dinitrogen trioxide*)

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NO – dušikov oksid (engl. *Nitric oxide*)

NO⁺ – nitrozil (engl. *Nitrosonium ion*)

NO⁻ – dušikov oksid, anion (engl. *Nitric oxide*)

NO₂⁻ – dušikov oksid, anion (engl. *Nitrogen dioxide, anion*)

NOS – dušik oksid sintaza (engl. *Nitric oxide synthase*)

nNOS – neuralna dušik oksid sintaza (engl. *Neuronal nitric oxide synthase*)

NF- kappa B – nuklearni faktor kappa B (engl. *Nuclear factor kappa B*)

¹O₂ – singletni kisik (engl. *Singlet oxygen*)

O₃ – ozon (engl. *Ozone*)

O₂⁻ – superoksidni ion (engl. *Superoxide ion*)

OH⁻ – hidroksidni ion (engl. *Hydroxide ion*)

ONOO⁻ – peroksinitrit (engl. *Peroxynitrite*)

p53 – tumor supresor protein (engl. *Tumor suppressor protein*)

p63 – tumor protein 63 (engl. *Tumor protein 63*)

p65 – tumor protein 65 (engl. *Tumor protein 65*)

PBS – fosfatna puferska otopina (engl. *Phosphate- buffered saline*)

PDGF – trombocitni faktor rasta (engl. *Plateled- derived growth factor*)

PDGF- B – trombocitni faktor rasta B (engl. *Plateled- derived growth factor B*)

PIGF – placentalni faktor rasta (engl. *Placental growth factor*)

ROO- – peroksilni radikal (engl. *Peroxyl radical*)

ROS – reaktivni kisikovi radikali (engl. *Reactive oxygen species*)

RNS – reaktivni dušikovi radikali (engl. *Reactive nitrogen species*)

SOD – superoksid dismutaza (engl. *Superoxide dismutase*)

TBA – 2- tiobarbituratna kiseline (engl. *2- thiobarbituric acid*)

TNB –5- tionitrobenzoična kiselina (engl. *5 Thio nitrobenzoic acid*)

TNF – faktor nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor*)

TPA – tkivni aktivator plazminogena (engl. *Tissue plasminogen activator*)

TrX – tiol (engl. *Thiol*)

VEGF – čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. *Vascular endothelial growth factor*)

VEGF- A – čimbenik rasta krvožilnog endotela A (engl. *Vascular endothelial growth factor A*)

VEGF- B – čimbenik rasta krvožilnog endotela B (engl. *Vascular endothelial growth factor B*)

VEGF- C – čimbenik rasta krvožilnog endotela C (engl. *Vascular endothelial growth factor C*)

VEGF- D – čimbenik rasta krvožilnog endotela D (engl. *Vascular endothelial growth factor D*)

VEGFR- 1 – receptor za čimbenik krvožilnog endotela 1 (engl. *Vascular endothelial growth factor receptor 1*)

XOD – ksantin oksidaza (engl. *Xantin oksidase*)

1. UVOD

1.1. OSOBITOSTI TUMORA

Formiranje tumora je proces koji uključuje više događaja i odvija se u određenom vremenskom periodu. Tijekom toga procesa akumulacija genetskih i epigenetskih promjena vodi do progresivne transformacije normalnih stanica u maligne (Gupta i sur., 2010).

Tumorske stanice posjeduju određene sposobnosti koje nisu nazočne u zdravim, netransformiranim stanicama; postaju otporne na inhibiciju rasta, proliferiraju bez ovisnosti o faktorima rasta, repliciraju se neograničeno, izbjegavaju apoptozu, invadiraju i metastaziraju, te podupiru angiogenezu (Gupta i sur., 2010).

Tumorski fenotipi rezultiraju disregulacijom više od 500 gena u više koraka u staničnim signalnim putevima (Gupta i sur., 2010). Stoga, inhibicija samo jednog genomskog produkta ili staničnog signalnog puta nije dovoljna za prevenciju ili liječenje raka (Gupta i sur., 2010). Pod normalnim fiziološkim uvjetima, ljudsko tijelo posjeduje homeostazu eliminirajući neželjeno, oštećeno i staro. Homeostaza je stanje koje organizam održava preko genetički programiranog puta, procesom apoptoze, odnosno procesom programirane stanične smrti (Gupta i sur., 2010). Stanice raka sposobne su izbjeći apoptozu i rasti brzim i nekontroliranim načinom, a jedan od glavnih načina preko kojega su stanice razvile tu sposobnost jest mutacija p53 tumor supresor gena. Bez funkcionalnog p53 stanice postaju neosjetljive na oštećenja DNA, koja bi u suprotnom izazvala kaskadu apoptotskih reakcija (Gupta i sur., 2010). p53 je tumor supresor gen, transkripcijski faktor, te glavni regulator u mnogim staničnim procesima uključujući staničnu signalnu transdukciju, stanični odgovor na DNA oštećenja, genomsku stabilnost, staničnu kontrolu i apoptozu (El- Rafaei i Mady, 2013). Kao tumor supresor, funkcionalni p53 aktivira transkripciju određenih gena za indukciju apoptotičkog procesa, inhibirajući rast DNA oštećenih stanica i stanica raka (El- Rafaei i Mady, 2013).

Kompletan set proteina, uključujući kaspaze i Bcl- 2 obitelj proteina, citokrom c i Apaf- 1, izaziva reakcije apoptoze intrinzičnim ili ekstrinzičnim putem. Intrinzični put je mitohondrij ovisan, dok je ekstrinzični pokrenut DRs (engl. *death receptors*). Neki antiapoptotički proteini, kao što su Bcl- 2 i Bcl- XL te survivin, preekspimirani su u širokom rasponu u tumoru (Gupta i sur., 2010).

Selektivno utišavanje antiapoptotičkih proteina i pojačano djelovanje proapoptotičkih proteina, te p53, u tumorskih stanicama nudi obećavajuću terapijsku intervenciju u liječenju tumora (Gupta i sur., 2010).

Poremećaj regulacije proliferacije jedna je od glavnih karakteristika karcinogeneze. U normalnim stanicama proliferacija je regulirana tankom granicom između signala rasta i signala koji suprimiraju rast (engl. *anti- growth signals*) (Gupta i sur., 2010). Naime, stanice raka posjeduju sposobnost generiranja vlastitih signala rasta i postaju neosjetljive na signale koji suprimiraju rast (Gupta i sur., 2010). Rast tumorskih stanica kontroliran je regulatorima staničnog ciklusa na prijezu iz G1 u S fazu, u S fazi i tijekom G2/M faze staničnog ciklusa (Gupta i sur., 2010).

Stanice u organima i tkivima, propale zbog isteka životnog vijeka u pravilu se nadomještaju novima iste vrste, tako da ukupan broj i struktura ostaju nepromijenjeni. Katkada se pojavi stanica koja izgubi normalne mehanizme regulacije rasta i koja se nastavlja nekontrolirano, autonomno, nesvrhsodno dijeliti i njezini potomci postaju besmrtni. To su tumorske stanice koje se množe u klon, klinički zamjetljiv kao tumor ili neoplazma (Andreis i sur., 2010).

Nastali tumorski čvor može rasti dobro ograničen od okolnoga zdravoga tkiva ili se može infiltrirati duboko u zdravo tkivo, razarajući ga i šireći se krvlju, limfom ili šupljinama organa u udaljene dijelove tijela (Andreis i sur., 2010). „Uspavane“ tumorske stanice mogu desetljećima opstati u tijelu prije nego što organiziraju prokrvljenost i izraze svoj maligni fenotip (Andreis i sur., 2010).

Zahvaljujući rastu krvnih žila tumor raste „agresivno“, infiltrirajući i destruirajući okolno tkivo (Andreis i sur., 2010).

U reakciju na tumorske stanice uključeni su nespecifični oblici imunosti, kao i oba oblika specifične imunosti: stanični i humoralni (Andreis i sur., 2010).

1.1.1. Stupnjevi progresije tumora

Tumorske stanice su potomci normalnih, zdravih stanica u kojima je do promjene u genetičkom kodu došlo zbog utjecaja neke vrste unutrašnjeg ili vanjskog stresa. Promjena u genetičkom kodu normalne stanice je događaj koji vodi u prekancerogeno stanje. U sljedećem stadiju, prekancerogena stanica se dijeli na stanice kćeri od kojih nastaju nove stanice kćeri itd. (El-Rafaei i Mady, 2013).

Tumorska stanica je nastala sa sposobnošću proizvodnje vlastitih proteina kao što su faktori rasta koji stimuliraju proliferaciju (El- Rafaei i Mady, 2013).

Konačno, u trećem stadiju karcinogeneze, progresiji, tumorska stanica se dijeli na stanice kćeri, koje se dalje dijele na nove stanice kćeri, što rezultira populacijom tumorskih stanica sa sposobnošću invazije i metastaziranja u okolno tkivo (El- Rafaei i Mady, 2013).

1.1.2. Metastaziranje

Metastaziranje jedno je od glavnih obilježja malignih bolesti i uzrok je smrti većine pacijenata s tumorom (Lee i sur., 2009). Jednom kada se solidni tumor proširi u druga tkiva i organe liječenje s trenutno dostupnim lijekovima, klinički zahvati i radioterapije, ne daju pozitivne rezultate, stoga je rano otkrivanje malignih tumora nužna za uspješno liječenje. Tumorske metastaze mogu se pojaviti već u ranoj fazi malignih bolesti i u velikom broju slučajeva metastatske bolesti ukazuju na tumor gdje otkriće primarnog tumora više nije moguće (Lee i sur., 2009).

Molekularni mehanizmi karakteristični za metastatske bolesti su kompleksni, a uključuju genetičke i epigenetičke promjene u malignim stanicama i tumorskom mikrookolišu (Lee i sur., 2009).

Određeni genetički događaji u malignim stanicama mogu dovesti do njihove invazije i metastaziranja. Na primjer, mutacije p53 vode do inaktivacije p63 i potiču TGF-ovisni invazivni i metastatski fenotip (Lee i sur., 2009).

Svi maligni tumori imaju sposobnost metastaziranja, tj. dio stanica može se otkinuti od primarnog tumora, otputovati na udaljeno mjesto i tamo stvoriti novu koloniju (Andreis i sur., 2010). Metastatski proces sastoji se od različitih koraka koji uključuju otkidanje tumorskih stanica od tumorske mase, invaziju u okolno tkivo, ulazak u krvnu ili limfnu žilu, ili pak kanal šupljeg organa, cirkuliranje krvnom ili limfnom strujom, zaustavljanje na ciljnome mjestu, prihvaćanje za stijenku i izlazak iz žile, implantaciju u okolno tkivo, proliferaciju i uspostavu nove opskrbe krvlju (Andreis i sur., 2010).

Tri neovisna procesa uključena su u invadiranje malignih tumora u zdrava tkiva; razgradnja izvanstaničnog matriksa (ECM), metastaziranje stanica i proliferacija (Ho i sur., 2010).

1.2. ANGIOGENEZA

Neprekidna ekspanzija tumorske mase zahtjeva formiranje novih krvnih žila kako bi se rapidno proliferirajuće tumorske stanice opskrbile dovoljnom količinom kisika i metabolita (Liao i Johnson, 2007). Angiogeneza je važna za rast i razvoj tumora (Xia i sur., 2007), a ujedno doprinosi i razvijanju principnih mehanizama za održavanje adekvatne opskrbe krvlju rastuće populacije stanica, uključujući i onu u tumorskim tkivima (Vaupel, 2004).

Eksperiment J. Folkman i suradnika iz 1962. godine bio je jedan od najranijih eksperimenata koji je pokazao da tumorski rast može biti zakočen ako se tumor drži u „prevaskularnom stanju“. Na osnovu toga moglo se zaključiti da su tumorski rast i metastaziranje ovisni o angiogenezi (Liao i Johnson, 2007). Svoja prva istraživanja angiogeneze započeli su proučavajući hemoglobinske otopine kao moguću zamjenu za transfuziju, a kasnije su spoznali da endotelne stanice bubre, ali da ne mogu proliferirati u hemoglobinskim otopinama koje ne sadržavaju trombocite (Lešin i sur., 2008). Naime, angiogeneza ili neovaskularizacija proces je formiranja novih krvnih žila iz već postojećih ili s pomoću endotelnih prekursorskih stanica (engl. *Endothelial progenitor cells*, EPCs) iz koštane srži (Lešin i sur., 2008; Adair i Montani, 2010). Dakle, formiranje krvnih žila odvija se na dva različita načina. Tijekom embrionalnog razvoja primitivno vaskularni labirint formiran je *in situ* diferencijacijom endotelnog prekursora stanica ili angioblasta, u procesu poznatom kao vaskulogeneza (Liao i Johnson, 2007). Jednom kada je primarni kapilarni set formiran, nove krvne žile nastaju nadograđivanjem na postojeću mrežu formirajući visoko organiziranu i funkcionalnu vaskulaturu u procesima rasta i remodeliranja, poznato kao angiogeneza (Liao i Johnson, 2007).

Regulacija intenziteta angiogeneze ovisi o ravnoteži angiogenih i angiostatskih čimbenika (Tablica 1).

Tablica 1. Endogeni angiogeni i angiostatski čimbenici

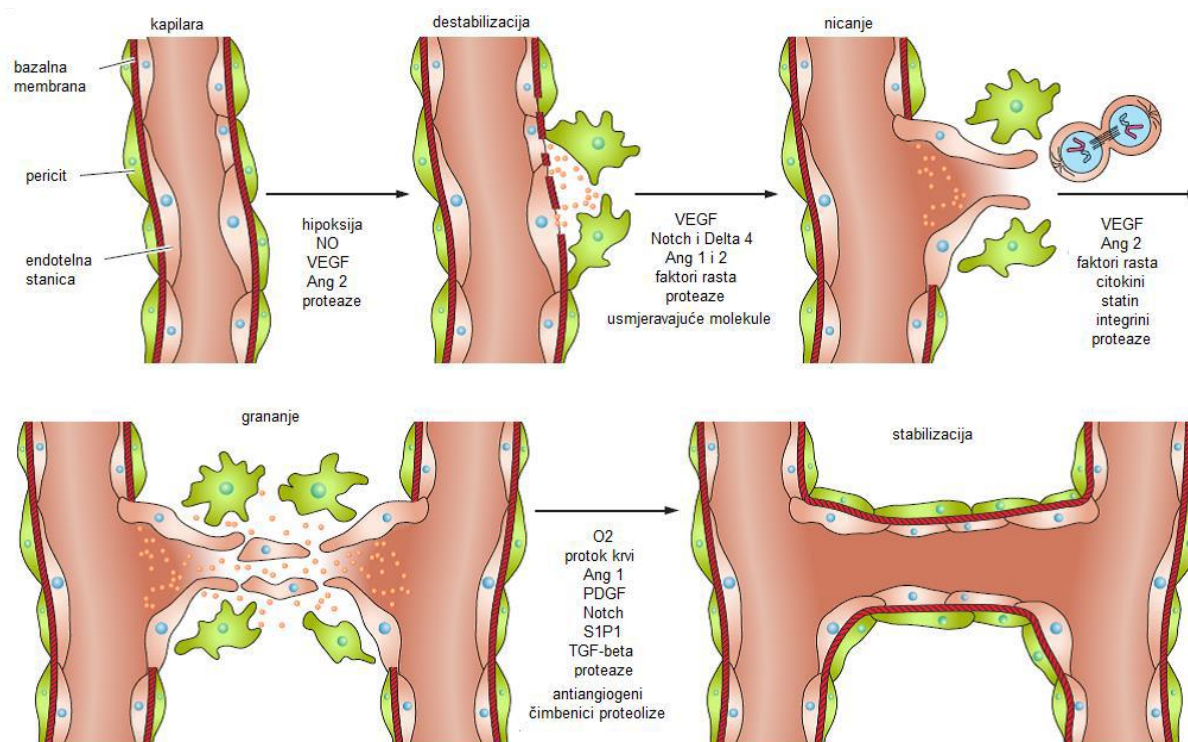
ANGIOGENI ČIMBENICI	MOLEKULARNA TEŽINA	ANGIOSTATSKI ČIMBENICI	MOLEKULARNA TEŽINA
Čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF)	40- 50	Angiostatin	38
Bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF)	18	Endostatin	20
Kiseli čimbenik rasta fibroblasta (aFGF)	16,4	Trombospondin	140
Transformirajući faktor rasta alfa (TGF alfa)	5,5	Trombocitni čimbenik 4 (PF4)	27-29
Transformirajući čimbenik rasta beta (TGF beta)	25	Interferon alfa	19- 26
Angiogenin	14,1	Antitrombin III	53
Čimbenik rasta endotelnih stanica izoliran iz trombocita (PD- EGF)	45	Troponin 1	22
Čimbenik rasta kolonije granulocita (G- CSF)	17	Interleukin 12	70-75
Angiopoetin 1	70	Vazostatin	21
Interleukin 8	40	Fragment prolaktina	18
Čimbenik rasta hepatocita	92	Konstatin	24
Čimbenik rasta posteljice	25	Restin	22

(Preuzeto od: Dedić Plavetić, Letilović, Vrbanec, 2003)

U ranoj fazi malignog procesa, dok je tumor u mirujućem stanju, karakterizira ga avaskularna faza u kojoj je razina stanične proliferacije u koorelaciji sa staničnom apoptozom. Tranzicija iz ne-angiogenskog stanja u stanje aktivnog rasta krvnih žila naziva je „angiogeni obrat“ (engl. „*angiogenic switch*“) (Krock, Skuli, Simon, 2011), proces prvi puta opisan u stanju tumorske progresije kod RIP-Tag transgeničnog modela miša (Liao i Johnson, 2007). Naime, tumorske stanice izolirane *in vitro* u ranim fazama tumorske progresije u ko-kulturi s endotelnim stanicama nisu dale angiogeni odgovor, koji se javio kod stanica izoliranih *in vitro* u kasnijim fazama tumorske progresije. Makrofagi i neutrofili pokazali su se kao sudionici „angiogenog obrata“ (Liao i Johnson, 2007).

Angiogeneza je proces koji se odvija pod utjecam više faktora (Slika 1); faktori rasta, citokini, kemokini, enzimi i andhezijske molekule, a najvažniji od svih je čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF), koji kao jedan od najvažnijih stimulirajućih faktora angiogeneze doprinosi progresiji tumora kroz procese tumorske neovaskularizacije, invazije tumora, matastaziranje i otpornosti na lijekove (Chinh Chung i sur., 2015).

VEGF je član PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) obitelji i sastoji se od homodimeričnih glikoproteina; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D, te placentalnog faktora rasta (engl. *placental growth factor*, PIGF) (Liao i Johnson, 2007).



Slika 1. Koraci u angiogenezi

Vazodilatacija javlja se kao odgovor na dušikov oksid (NO), čija je proizvodnja potaknuta stanjem hipoksije. NO zajedno s VEGF-om, angiopoetinom -1 i -2 (Ang 1 i Ang 2) stupa u reakcije s metaloproteinazama i dolazi do povećanja permeabilnosti staničnih stijenki. Migracija i proliferacija endotelnih stanica u tubule potpomognuta je VEGF-om, angiopoetinima, citokinima, statinima, integrinima i proteazama. Sazrijevanje novostvorenih krvnih žila popraćeno je utjecajem antiangiogenih čimbenika otpuštenih tijekom procesa proteolize.

(Preuzeto od: Clapp i sur., 2009)

Dijelovi ovog procesa su:

- Vazodilatacija kao odgovor na dušikov oksid (NO) i izazvanu pojačanu popustljivost već postojećih krvnih žila zbog djelovanja VEGF-a
- Proteolitička razgradnja bazalne membrane roditeljskih krvnih žila metaloproteinazama (MMPs) i prekid međustaničnog doticaja između endotelnih stanica krvnih žila uzrokovan aktivirajućim čimbenikom plazminogena
- Migracije endotelnih stanica prema angiogenom stimulatoru
- Proliferacija i sazrijevanje endotelnih stanica što uključuje inhibiciju rasta i remodeliranje u kapilaru
- Mobiliziranje periendotelnih stanica (uključujući pericite za male kapilare i glatke mišićne stanice za velike krvne žile) da bi podržavale endotelne strukture i formirale pravu krvnu mrežu (Lešin i sur. 2008)

1.2.1. Hipoksija kao posljedica angiogeneze

Solidni tumori čine gotovo 90 % svih poznatih tumora, razvijaju se iz jedne mutirane stanice i vode do značajnog morbiditeta i mortaliteta, invadirajući u okolno tkivo ili metastazirajući u vitalne organe poput pluća, jetre ili mozga. Proces tumorske progresije, proliferacija, lokalna invazija, udaljene metastaze, karakteriziran je rapidnim rastom stanica i praćen je promjenama mikrookoliša tumorskih stanica koje su rezultat nedovoljne opskrbe kisikom, a koje rezultiraju hipoksijom ili, čak, anoksijom (Vaupel, 2004). Kako bi prešli veličinu od 1 mm novo razvijeni tumori moraju formirati vlastitu mrežu krvnih žila koja nastaje ili iz već postojećih ili iz novih krvnih žila pod utjecajem faktora angiogeneze (Vaupel, 2004). Mreža krvnih žila u tumorskoj masi razlikuje se od one u normalnim tkivima, pokazujući veliki broj strukturalnih i funkcionalnih abnormalnosti koje vode do iregularnog i sporog krvnog protoka, te na taj način smanjujući tumorskim stanicama opskrbu kisikom i nutrijentima što za posljedicu ima pojavu hipoksičnih i anoksičnih aresta (Vaupel, 2004).

Status oksigenacije u tumoru može biti pogoršan i povećanjem difuzijske udaljenosti koja nastaje kada tumorske stanice prijeđu udaljenosti koje im omogućavaju normalnu opskrbu kisikom preko krvnih žila (Vaupel, 2004).

Maligne progresije povezane s hipoksijom tumora pokazuju da mogu biti vođene jednim mehanizmom, određenim, ili s više njih, uključujući promjene u genskoj ekspresiji, inaktivaciju tumor supresor gena ili aktivaciju onkogeni, genomsku nestabilnost ili klonalnu selektivnost (Vaupel, 2004).

1.2.2. Hipoksija, HIF- 1 i VEGF

Hipoksija može inducirati promjene koje omogućuju tumorskim stanicama uspješnu prilagodbu ili prevladavanje stanja smanjene količine kisika i nutrijenata, te preživljenje ili bijeg iz prvobitnog mjesta. Hipoksija izazvana angiogeneza, glikoliza, inhibicija apoptoze i “up-regulacija” faktora rasta i ostalih proteina uključenih u invazivnost tumora, induciraju utišavanje adhezijskih molekula olakšavajući tumorskim stanicama otkidanje od primarne mase (Vaupel, 2004). Mnogi hipoksijom aktivirani geni kontrolirani su inducibilnim faktorom hipoksije- 1 (engl. *Hypoxia inducible factor- 1, HIF- 1*) (Vaupel, 2004).

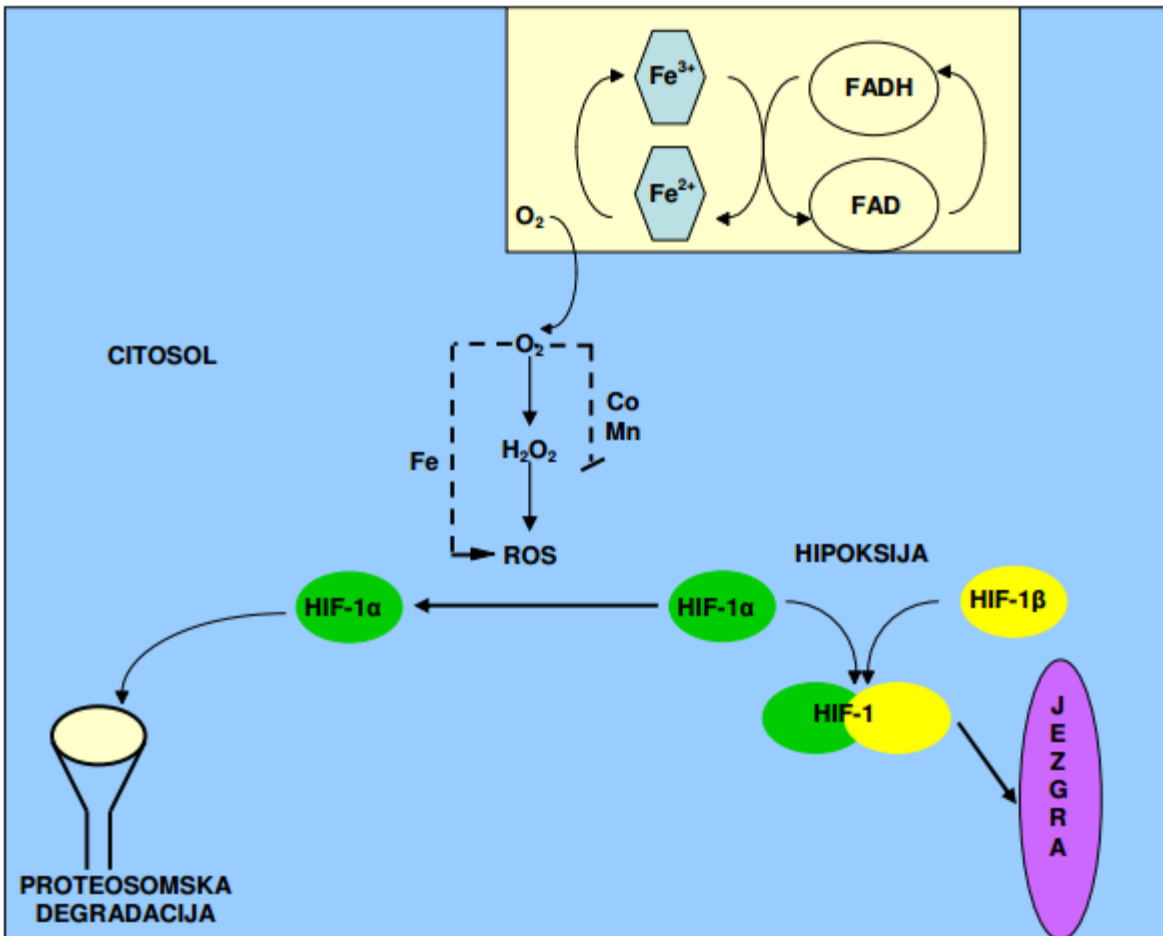
Naime, jedan od glavnih stimulatora angiogeneze je vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular endothelial factor, VEGF*), esencijalan za staničnu proliferaciju i migraciju, omogućavajući formaciju novih krvnih žila (Vaupel, 2004). Produkcija VEGF-a upravljana je hipoksijom preko aktivacije HIF-1 (Vaupel, 2004).

Pod normalnim uvjetima ubikvitinizacija HIF- 1 alfa djeluje na podjedinice zadužene za proteaznu degradaciju. HIF- 1 beta u uvjetima hipoksije veže se na HIF- 1 alfa. Nastaje aktivni dimer koji prepoznaje DNA vezujuća mjesta. Dolazi do koaktivacije aktivnog dimera i DNA vezujućeg mjesta, transkripcije i sinteze mRNA što dalje vodi ka biosintezi proteina koja dalje posreduje u hipoksičnom odgovoru (Vaupel, 2004).

Osim VEGF-a, PDGF- B, VEGFR- 1, ET- 1, iNOS, MPK, adrenomedulin i EGF genski su produkti i receptori regulirani s HIF-1. Od navedenih, iNOS, ET-1, HO-1 i adrenomedulin pokazalo se da imaju važnu ulogu u regulaciji lokalnog krvnog protoka modulirajući vaskularni tonus (Vaupel, 2004).

Stanice nedovoljno oksigenirane pokazuju serije adaptivnih odgovora koji omogućuju daljnju proliferaciju i preživljenje stanica.

Promjene u ekspresiji gena za eritropoetin, VEGF, receptore transferina i ostalih proteina omogućuju veću opskrbu kisikom i nutrijentima, dok je druga grupa gena uključena u adaptivne odgovore koji kontroliraju metaboličke puteve (Vaupel, 2004). Ekspresija gena za većinu ovih protein regulirana je HIF-1 alfa transkripcijskim faktorom prvotno identificiranim eksperimentom Semenze i suradnika, kao regulator eritropoetinske ekspresije inducirane hipoksijom (Vaupel, 2004). Otada do danas pokazano je da HIF-1 alfa regulira ekspresiju više od 30 ciljnih gena, koji igraju važnu ulogu u tumorskoj progresiji doprinoseći tumorskoj agresivnosti (Vaupel, 2004). HIF-1 alfa konstantno je degradiran preko ubikvitin-proteaznog puta u dobro oksigeniranim stanicama. Pod hipoksičnim uvjetima, HIF-1 alfa podjedinica translocira se u jezgru gdje se povezuje s HIF- 1 beta podjedinicom čineći heterodimer (Slika 2), odnosno aktivan HIF-1 protein koji se veže za specifične dijelove u ciljnim genima odgovorima za hipoksiju, aktivirajući transkripciju tih gena koji kodiraju eritropoetin, VEGF, razne glikolitičke enzime, transferin i druge proteine esencijalne za sustavnu, lokalnu i unutarstaničnu homeostazu (Vaupel, 2004).



Slika 2. Regulacija HIF- 1 ekspresije

U hipoksičnim uvjetima HIF- 1 alfa translocira se u jezgru i spaja s HIF- 1 beta podjedinicom. Formira se HIF- 1 kompleks.

(Preuzeto od: http://medlib.mef.hr/217/1/Gordana_Pavlis_doktorska_disertacija.pdf)

Ostali faktori uključeni u regulaciju kisika posredovanog transkripcijom ciljnih gena su NF-kappa B i AP-1. NF-kappa B može biti aktiviran hipoksijom, a aktivacija vodi do transkripcije ciljnih gena, poput proupalnih citokina i COX-2, od kojih je NF-kappa B pokazao važnu ulogu u regulaciji apoptoze vode do prekomjerne ekspresije anti-apoptotičkog faktora bcl-2, a COX-2 angiogene karakteristike i sposobnost stimulacije rasta aktivirajući gene za urokinaze, poput plazminogen aktivatora i MMP-2, oba povezana s tumorskom invazivnošću (Vaupel, 2004).

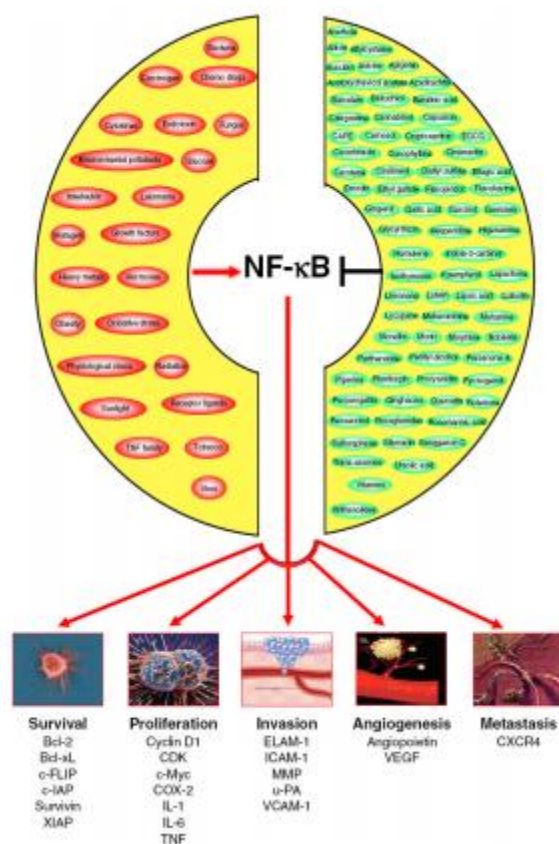
Hipoksija sa ili bez reoksigenacije doprinosi genskoj nestabilnosti kroz mutacije, genske amplifikacije i kromosomska rearanžiranja (Vaupel, 2004). Glavne mutacije mogu se razviti u tumorskim stanicama izloženima hipoksiji ili reoksigenaciji kroz određene mehanizme poput nedovoljnog popravka DNA, pogreške u replikaciji DNA ili, pak, oboje (Vaupel, 2004). Naime, metaboličke promjene DNA baza mogu igrati važnu ulogu u mutacijama, jer reoksigenacija slijedova uzrokovana stanjem hipoksije može izazvati oksidativnu štetu koja ima potencijal dovesti do različitih pirimidinskih i purinskih promjena u DNA (Vaupel, 2004).

1.3. UPALA

Upala je lokalizirana reakcija tkiva na infekciju, iritaciju ili neki drugi oblik ozljede. Zadržavanjem upale u organizmu ili poremećajem regulacije kontrolnih mehanizama otvara se mogućnost razvoju bolesti, npr. tumora (El- Rafaei i Mady, 2013).

Upala je prisutna u svim stadijima razvoja tumora; inicijaciji, promociji, progresiji, pa čak i metastaziranju. Tijekom faze inicijacije tumora upala potiče stanice na otpuštanje različitih citokina i kemokina koji potiču aktivaciju upalnih stanica i njima pridruženih faktora što vodi do daljnjih oštećenja, DNA mutacija i brojnih drugih promjena u mikrokolištu tkiva, čineći ga podložnijim za staničnu transformaciju, povećano preživljenje stanica i proliferaciju (El- Rafaei i Mady, 2013).

Na molekularnoj razini, glavnina kroničnih bolesti, uključujući i tumor, povezane su s poremećajem regulacije upalnih odgovora, a NF- κ B predstavlja jednu od glavnih poveznica između upale i razvoja tumora (Slika 3) (Gupta i sur., 2010).



Slika 3. Utjecaj NF-kB na razvojne stadije u tumorskoj progresiji.

Tumorska progresija uključuje procese preživljavanja, proliferacije, invazije, angiogeneze i metastaziranja. Aktivacija NF-kB regulira razvoj tumorskih stanica djelujući na jedan ili više koraka u tom razvojnog putu. Karcinogeneza aktivira NF-kB, dok ga nutraceutici inhibiraju.

(Preuzeto od: Gupta i sur., 2010)

U fazi mirovanja, NF- κ B smješten je u citoplazmi kao heterotrimer sastojuci se od podjedinica p50, p65 i inhibitorne podjedinice I κ B alfa. Aktivacijom NF- κ B, jedna od heterotrimernih podjedinica I κ B alfa prolazi kroz procese proliferacije, ubikvitinizacije i razgradnje, a p50 i p65 se otpuštaju i translociraju u jezgru, pritom vezujući specifične DNA slijedove promotora različitih gena, inicirajući njihovu transkripciju. Veliki broj proteina uključen je u NF-kappa B signalni put (Gupta i sur., 2010). Aktivni kompleksi NF-kappa B mogu doprinijeti tumorogenezi regulirajući gene koji utječu na rast i preživljenje tumorskih stanica, tijekom staničnog ciklusa.

NF- κ B ima sposobnost regulirati inducibilnu dušik-oksida sintazu (engl. *nitric oxide synthase*, iNOS) u određenim stanicama aktiviranim različitim proupalnim tvarima (El- Rafaei i Mady, 2013).

Nadalje, dokazano je da upala dovodi do produkcije reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i reaktivnih dušikovih radikala (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), a oni rezultiraju oksidativnim oštećenjima i nitracijom DNA baza, povećavajući rizik od DNA mutacija i razvoja tumorske bolesti (El- Rafaei i Mady 2013).

1.4. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDANSI

Slobodni radikali formirani su kao posljedica generiranja energije u stanicama preko produkcije ATP-a u mitohondrijima. Produkcijom ATP-a u stanicama dolazi do nakupljanja uglavnom reaktivnih kisikovih jedinki (ROS), ali i do nakupljanja slobodnih dušikovih jedinki (RNS) koji su rezultat staničnih redoks procesa. Niske razine ROS-a i RNS-a imaju pozitivne učinke na stanične odgovore i imunosne funkcije, dok visoke koncentracije kisikovih i dušikoih radikala dovode do nakupljanja oksidativnog stresa i oštećivanja staničnih struktura (Pham- Huy i sur., 2008). Oksidativni stres ima važnu ulogu u razvoju kroničnih i degenerativnih bolesti, kao što su tumor, artritis, starenje, autoimuni poremećaji, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Ljudsko tijelo se protiv oksidativnog stresa bori produkcijom antioksidanasa koji su ili producirani *in situ* ili unešeni preko hrane i/ili dodataka hrani. Endogeni ili egzogeni antioksidansi ponašaju se kao sakupljači slobodnih radikala sprječavajući ili popravljajući štetu nastalu ROS-om ili RNS-om, te na taj način pojačavajući imunološku obranu organizma i snižavajući rizik od nastanka raka i degenerativnih bolesti (Pham-Huy i sur., 2008).

Teorija o slobodnim kisikovim radikalima poznata je preko više od 50 godina (Pham-Huy i sur., 2008), ali tek su u zadnja dva desetljeća otkrivena njihova značajna djelovanja na razvoj bolesti, kao i protektivni učinci antioksidanasa (Pham-Huy i sur., 2008).

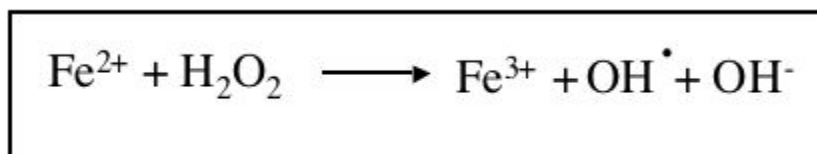
Slobodnim radikalima nazivaju se molekule sa jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskim ljuskama elektronskog omotača. Slobodni radikali uključuju (OH^{\bullet}) , $(O_2^{\bullet-})$, (NO^{\bullet}) , (NO_2^{\bullet}) , (ROO^{\bullet}) i (LOO^{\bullet}) (Pham-Huy i sur., 2008).

Vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), singletni kisik (1O_2), hipoklorična kiselina ($HOCl$), (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), dinitrogen trioksid (N_2O_3), ($LOOH$), nisu slobodni radikali i općenito se nazivaju oksidima, ali kroz reakcije u organizmu od njih lako mogu nastati slobodni radikali.

Nadalje, slobodni radikali predstavljaju izrazito nestabilne molekule čiji slobodni elektron lako stupa u reakciju s organskim supstratima, kao što su lipidi, protein i DNA (Pham-Huy i sur., 2008).

Formiranje ROS-a i RNS-a u stanicama se može odvijati na dva načina: enzimskim i neenzimskim reakcijama. Reakcije uključene u respiratorni sustav, fagocitoza, sinteza prostaglandina i citokrom P450 sustav, enzimske su reakcije uključene u nakupljanje slobodnih radikala. Na primjer, nakupljanje superoksidnog aniona odvija se kroz nekoliko staničnih oksidativnih sustava kao što su NADPH oksidaza, ksantin oksidaza i peroksidaze (Pham- Huy i sur.,2008). Jednom formirani superoksidni anioni sudjeluju u različitim reakcijama rezultirajući stvaranjem ROS-a i RNS-a- vodikov peroksid, hidroksilni radikal, ONOO^- , HOCl i dr. Vodikov peroksid je ne-radikalni spoj koji nastaje kroz određene reakcije oksidaznih enzima, uključujući aminokiseline i ksantin oksidaze (Pham- Huy i sur., 2008).

Hidroksilni radikal najreaktivniji je slobodni radikal, nastao katalitičkom reakcijom superoksidnog aniona i vodikovog peroksida u prisutnosti Fe^{2+} ili Cu^+ - reakcija poznata kao Fentonova reakcija (Slika 4) (Pham- Huy i sur., 2008).



Slika 4. Fentonova reakcija

(Preuzeto od: <http://biomedfrontiers.org/infection-2014-5-16/>)

Osim enzimskim reakcijama, slobodni radikali mogu nastati i ne-enzimskim putem u reakciji kisika s organskim sastavnicama, kao i s onima nastalim kao posljedica ionizirajućeg zračenja. Ne-enzimatski procesi, isto se tako mogu odviti za vrijeme trajanja oksidativne fosforilacije u mitohondijima, pr. aerobna respiracija (Pham- Huy i sur., 2008).

1.4.1. Reaktivni kisikovi radikali (ROS)

Slobodni radikali i derivati radikala, te neradikalne čestice, u visokim koncentracijama predstavljaju opasnost za žive organizme i glavne stanične sastavnice. U umjerenim koncentracijama dušikov oksid, superoksidni anion i njima srodni reaktivni kisikovi radikali (ROS) (Tablica 2), igraju važnu ulogu regulatornih posrednika staničnog signalnog puta (Dröge, 2002).

Tablica 2. Reaktivni kisikovi spojevi

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
superoksidni, O_2^-	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroksilni, OH^\bullet	hipokloritna kiselina, $HOCl$
peroksilni, ROO^\bullet	ozon, O_3
alkoksilni, RO^\bullet	singletni kisik, 1O_2
hidroperoksilni, HO_2^\bullet	

(Preuzeto od: Štefan i sur., 2007)

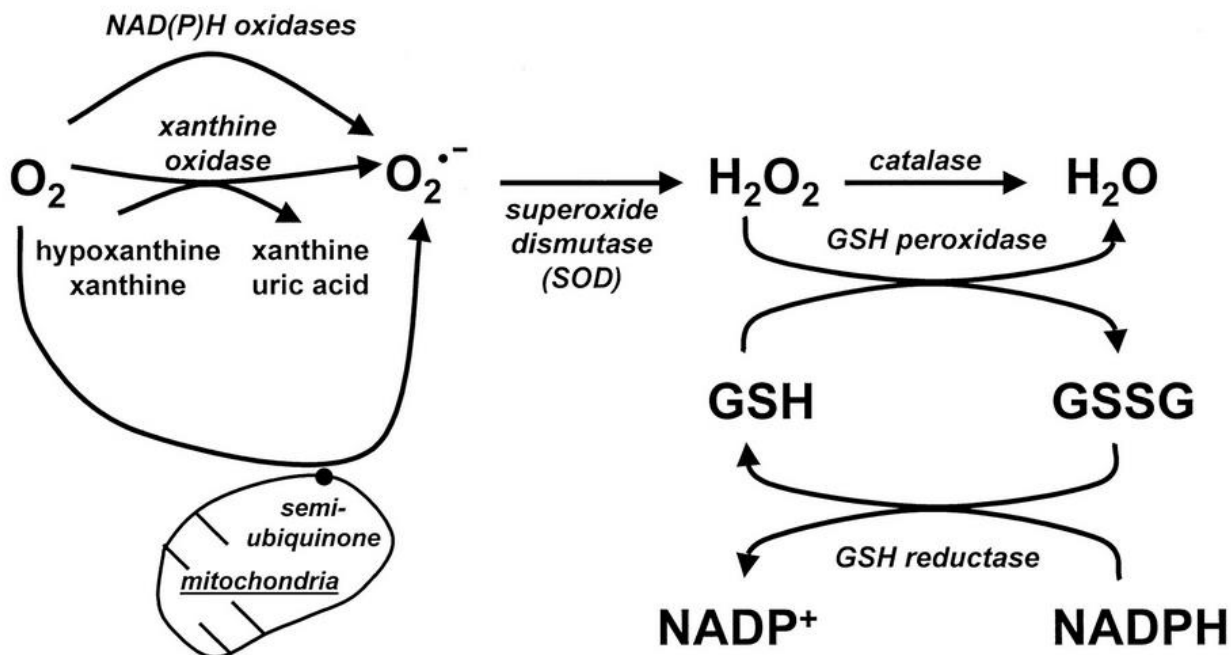
Veliki broj staničnih odgovora posredovanih ROS-om štite organizam od oksidativnog stresa i održavaju, točnije obnavljaju, homeostazu. NO i ROS organizmi koriste kao signalne molekule u svrhu regulacije vaskularnog tonusa, nadzora tlaka kisika pri ventilaciji i proizvodnji eritropetina, te signalnu transdukciju membranskih receptora u različitim fiziološkim procesima (Dröge, 2002).

Generiranje dušikovog oksida i reaktivnih kisikovih čestica odvija se uz pomoć enzima NO sintaze (NOS) i izoformi NAD(P)H oksidaze.

Nadalje, prevelika količina ROS-a može nastati ili od pretjeranog stimuliranja NAD(P)H oksidazom ili od manje reguliranih izvora kao što je transportni mitohondrijski lanac elektora (Dröge, 2002).

Prekomjerne količine ROS-a ili njihova produljena proizvodnja zapažena je u raznim bolestima, kao što su tumori, šećerne bolesti, ateroskleroze, neurodegenerativne bolesti, reumatoidni artritis, ishemije, opstruktivne apneje u snu i dr. (Dröge, 2002).

Superoksidni anion formiran je jednovalentnom redukcijom tripletnog stanja molekularnog kisika ($^3\text{O}_2$) uz posredstvo enzima, kao što su NAD(P)H oksidaze i ksantin oksidaze ili ne-enzimski preko redoks reaktivnih spojeva (Superoksidne dismutase (SODs) konvertiraju superoksid u vodikov peroksid (Dröge, 2002). Nadalje, u biološkim tkivima superoksid može biti konvertiran ne-enzimski u neradikalne čestice vodikovog peroksida i singletni kisik ($^1\text{O}_2$) (Droge, 2002). U prisutnosti reduciranih prijelaznih metala (pr. željezni ili bakreni ioni) vodikov peroksid može biti konvertiran u visoko reaktivni hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) (Dröge, 2002). Isto tako, vodikov peroksid može biti konvertiran u vodu preko enzima katalaze i glutathion peroksidaze (Slika 5) (Dröge, 2002).



Slika 5. Putevi produkcije ROS-a

Preko enzima katalaze i glutation peroksidaze, vodikov peroksid, kao čestica koja ne predstavlja slobodni radikal, može biti konvertiran u vodu.

(Preuzeto od: Dröge, 2002)

U reakciji glutation peroksidaze, glutation je oksidiran do glutation disulfida koji može biti povratno konvertiran u glutation preko glutation reduktaze uz $NADPH$ posredovani proces. ROS uzrokuju promjene na proteinima. Oksidativne promjene mogu dovesti do promjena u funkciji proteina, kemijskoj fragmentaciji ili povećanja preosjetljivosti na proteolitički utjecaj (Dröge, 2002).

1.4.2. Produkcija ROS-a preko fagocitozne NADPH oksidaze

Oksidativni stres javlja se kao posljedica neravnoteže u formiranju i neutraliziranju ROS/RNS-a (Pham- Huy i sur., 2008). Aktivirani makrofagi i neutrofili mogu proizvesti velike količine superoksida i njegovih derivate preko fagocitne izoforme NADPH oksidaza. U upalnom okruženju vodikov peroksid proizveden je aktiviranim makrofagima na otprilike $2^{-6} \times 10^{-14}$ mol h i može dosegnuti koncentraciju od 10 - 100 mM (Dröge, 2002). Produkcija velike količine ROS-a u upalnom okolišu naziva se i oksidativni prasak (engl. *oxidative burst*), te igra važnu ulogu kao prva crta obrane od okolišnih patogena.

Fiziološka važnost NADPH oksidaze kao obrambenog spoja predložena je zbog opažanja što mišu nedostaje NADPH oksidazna komponenta gp91phox ili, pak, p47 pokazuje smanjenu otpornost na infekciju (Dröge, 2002).

Kombinirana aktivnost NADPH oksidaze i mijeloperoksidaze u fagocitima vodi do produkcije HClO, jedne od najjačih fizioloških oksidanasa i snažnog antimikrobnog spoja (Dröge, 2002). Stimulirani neutrofili i makrofagi generiraju singletni kisik preko reakcija koje uključuju mijeloperoksidaze ili NADPH oksidaze (Dröge, 2002). Nadalje, fiziološka relevantnost u koncentracijama ROS-a može modulirati redoks-osjetljivu signalnu kaskadu i pojačati imunološku funkciju limfocita (Dröge, 2002).

Produkcija ROS-a nefagocitnom NAD(P)H oksidaznim izoformama ima ulogu u regulaciji unutarstaničnih signalnih kaskada u različitim tipovima nefagocitnih stanica- fibroblasti, entolne stanice, glatke mišićne stanice, srčani miociti i tiroidno tkivo (Dröge, 2002).

1.4.3. Nuklearni faktor- kappa B (NF- kB) i ROS

NF- kappa B uključen je u induciranu ekspresiju gena IL-2 i u široki raspon bioloških odgovora-upalne reakcije, kontrola rasta i apoptoza (Dröge, 2002) , te je prvi eukariotski transkripcijski factor koji je pokazao direktan odgovor na oksidativni stres u određenim tipovima stanica (Dröge, 2002). Naime, veliki broj eksperimenata pokazuje da ROS ko-modulira aktivacijom NF-kappa B u određenim tipovima stanica pod određenim uvjetima,a najmanje dva mehanizma pridonose ovom efektu (Dröge, 2002).

Prvi mehanizam uključuje ROS-om posredovano pojačanje IκB razgradnje. Obrada stanica HeLa vodikovim peroksidom inducira pojavu modificirane forme inhibitora IκBalfa, koja se brzo razgrađuje odgovarajućom stimulacijom, izuzev ako je proteoliza inhibirana proteasomnim inhibitorom (Dröge, 2002). Obrada antioksidansom pokazao se učinkovitom u blokiranju razgradnje IκBalfa nakon stimulacije TNF-om, TPA ili lipopolisaharidom (Dröge, 2002).

Prekomjerna ekspresija glutathion peroksidaze spriječava TNF-om posredovanu akumulaciju modificirane forme IκB alfa (Dröge, 2002), a obrada antioksidanskom N-acetilcisteinom pokazao je inhibiciju NF-kappa B aktivacije i IκB alfa razgradnje, ali ne i IκB alfa fosforilacije (Dröge, 2002). Ukratko, prvi se mehanizam bazira na pojačanoj proteolitičkoj razgradnji NF-kappa B inhibitora i kappa B nakon izlaganju djelovanju ROS-a (Dröge, 2002).

Drugi mehanizam uključuje povećanu IκB- kinaznu alfa aktivnost nakon izlaganja vodikovom peroksidu ili pro-oksidativnim promjenama glutathion redoks stanja unutar stanice. Da bismo inducirali ekspresiju specifičnih gena, transkripcijski faktori moraju vezati specifične slijedove izrazito kisele, negativno nabijene DNA. Vezujuća regija transkripcijskih faktora uglavnom sadrži nakupljene pozitivno nabijene amino kiseline (Dröge, 2002). Naime, akumulacija pozitivnog naboja može stabilizirati deprotonirane tiolne grupe, čineći svaku cisteinsku grupu u DNA vezujućoj regiji visoko osjetljivom na oksidaciju. Na primjer, transkripcijski factor NF-kappa B i ostali članovi NF- kappa B obitelji dijele jednaki afinitet prema jednom cisteinskom i tri argininska ostatka DNA vezujuće regije (Dröge, 2002).

DNA vezujuća aktivnost prema NF- kappa B je lako inhibirana oksidacijom *in vitro* i reaktivirana tiolima (2-merkaptoetanol, ditioneitol, TrX) (Dröge, 2002). Fiziološki relevantne koncentracije glutation disulfida inhibiraju vezanje DNA na NF-kappa B, unatoč višestrukoj prisutnosti tiola, dok je DNA vezujuća aktivnost bila obnovljena fiziološki relevantnim koncentracijama reduciranog Trx (Dröge, 2002). NMR studije su pokazale direktno vezanje Trx peptide na DNA vezujuću domenu NF-kappa B (Dröge, 2002).

1.4.4. Tumori i ROS

Povećano nakupljanje ROS-a često se smatra “cancer- promoting” faktorom, a razni eksperimenti pokazali su kako visoke razine ROS-a mogu uzrokovati staničnu štetu i igrati važnu ulogu u posredovanju apoptoze (Chem i sur., 2009). Pokazano je i da ROS selektivno uništava stanice raka (Chem i sur., 2009). Naime, Hileman i suradnici eksperimentom su pokazali kako nakupljanje ROS-a može imati i pozitivan učinak na organizam na način da uništava stanice raka bez da normalne, zdrave limfocite izlaže citotoksičnosti (Chem i sur., 2009).

Razvoj tumorske bolesti kompleksan je proces koji uključuje stanične i molekularne promjene posredovane različitim endogenim i egzogenim stimulansima. Inicijacija i promocija tumora povezane su s kromosomskim oštećenjima i aktivacijom onkogeno induciranim slobodnim radikalima. Važnim događajem u kemijskoj karcinogenezi smatra se hidoksilacija DNA baza i tako formirani produkt međudjeluje s normalno rastućim stanicama uzrokujući genetičke mutacije i promjene u transkripciji normalnih gena. Šteta na DNA uzrokovana oksigenacijom rezultira brojnim modifikacijama u strukturi DNA (Pham- Huy i sur., 2008).

Nekoliko podataka ukazuje na to da su ROS uključene u karcinogenezu:

- a) neki faktori rasta, poput EGF-a, inzulina i angiopoetina 1, povećavaju produkciju ROS-a u stanicama u svrhu regulacije stanične migracije i proliferacije
- b) prirodni antioksidansi mogu inhibirati proliferaciju tumorskih stanica i rast tumora
- c) visoke razine ROS-a uočene su kod nekih tumorskih stanica, što dovodi do daljnjih oštećenja DNA, genomske nestabilnosti i na kraju i inicijacije tumora
- d) ROS inducira aktivaciju MAP kinaza, NF-kappa B i AP-1 za koje je poznato da su povezani s razvojem tumorske bolesti (Xia i sur., 2007).

1.4.5. Uloga antioksidanasa

Endogene sastavnice u stanicama se mogu klasificirati kao enzimski antioksidansi ili neenzimski antioksidansi, a glavni enzimski antioksidansi direktno uključeni u proces neutralizacije ROS-a i RNS-a su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx) i glutation reduktaza (GRx) (Pham- Huy i sur., 2008).

Ne-enzimatski antioksidansi podijeljeni su na metaboličke antioksidanse i antioksidanse iz nutrijenata (Pham- Huy i sur., 2008).

SOD, kao prva linija obrane organizma od utjecaja slobodnih radikala, katalizira simultano odvijanje oksidacije i redukcije radikala superoksidnog aniona u vodikov peroksid. Procesom redukcije formirani vodik peroksid katalazom ili glutation peroksidazom transformira se u vodu i kisik (Pham- Huy i sur., 2008).

Antioksidanski proces može funkcionirati na dva načina: kidanjem lanaca ili prevencijom. Naime, kidanje lanca karakterizirano je otpuštanjem ili uzimanjem elektrona od drugih molekula, stvaranjem novih radikala sve dok se ne formiraju stabilni radikali ili jednostavnije, raspadanjem radikala u neškodljive produkte. Klasičan primjer kidanja lanaca je lipidna peroksidacija (Pham- Huy i sur., 2008).

Drugi način je prevencija. Enzimi poput superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze mogu preventivno djelovati na oksidaciju na način da unaprijed reduciraju lančane inicijacije u formiraju krajnjih, stabilnih produkata (Pham-Huy i sur., 2008).

1.4.6. Dušikov oksid (NO)

Dušikov oksid (NO) ponaša se kao endotelni stanični faktor preživljavanja inhibirajući apoptozu induciranu kaspazama i promovirajući staničnu proliferaciju (Pham- Huy i sur., 2008). Pokazano je kako upala dovodi do oksidativnog oštećenja i nitracije DNA baza čime se povećava rizik od DNA mutacija koje dalje vode do nastanka tumora (Pham- Huy i sur., 2008).

NO je povezan s upalnom reakcijom, a njegova velika proizvodnja je patogena za tkivo, jer kao reaktivni radikal direktno uništava funkcije zdravog tkiva (El- Rafaei i Mady, 2013). Koncentracija NO u krvi posljedica je ravnoteže između stvaranja NO pomoću NO sintaza i vezanja NO na hemoglobin i tione u procesu nitrozacije te pretvorbe u nitrite (NO_2^-) i nitrate (NO_3^-) (Hudiček Martinić i sur., 2004). Zbog svoje male veličine i lipofilnosti NO izrazito brzo difundira kroz stanične membrane i regulira široki raspon fizioloških i patoloških procesa (El-Rafaei i Mady, 2013).

Dušik oksid sintaze (NOS) su grupa enzima koja sintetizira NO, molekulu s poluživotom od samo nekoliko sekunda u biološkim tkivima (El- Rafaei i Mady, 2013) i koja ovisno o mikrookolišu može biti konvertirana u različite reaktivne dušikove jedinice (RNS); NO^+ , NO^- ili ONOO^- (Dröge, 2002).

Enzim NOS postoji u tri izoforme: nNOS, iNOS i eNOS, a mnoga tkiva eksprimiraju jedan ili više ovih izoformi (Dröge, 2002). Naime, izoforme nNOS i eNOS konstantno su eksprimirane, ali je njihova aktivnost regulirana unutarstaničnim koncentracijama kalcija. Izoforma iNOS je eksprimirana u makrofagima nakon stimulacije makrofaga citokinima, lipopolisaharidima i ostalim imunološki relevantnim tvarima (Dröge, 2002).

Nadalje, ekspresija iNOS-a regulirana je i transkripcijskim i post-transkripcijskim razinama preko signalnih puteva koji uključuju spojeve poput NF- κ B ili MAPKs (Dröge, 2002).

Razina NO sintetaze detektibilna je do određene razine, točnije do razine dostupnosti L-arginina i ko- faktora BH4 (Dröge, 2002).

1.5. POLIFENOLI

Polifenoli su skupina fitokemikalija; jedna od njihovih podgrupa sastoji se od mono-, oligo- i polimeričnih flavanola što ih čini različitima u pogledu strukture (Lewandowska i sur., 2013). Strukturalne razlike su odgovorne za njihove pleiotropične aktivnosti, kao i za djelovanje na prevenciju raka (supresija angiogeneze, invazije tumorskih stanica, metastaziranje i indukciju apoptoze (Lewandowska i sur., 2013).

Poznato da polifenoli imaju važnu ulogu u fiziološkim procesima ljudskog organizma- štite membrane ljudskih stanica od oštećenja slobodnim radikalima, te doprinose prevenciji brojnih bolesti povezanih s oksidativnim stresom (Escarpa i Gonzalez, 2001).

Biodostupnost polifenola ovisi o brojnim faktorima; strukturi polifenola, topljivosti u vodi, količini hrane unsene u organizam, polifenolnoj koncentraciji u konzumiranoj hrani i dr. (Lewandowska i sur., 2013).

Glavnina polifenola u hrani prisutna je u obliku polimera ili glikozida, koji nisu biorazgradivi i kao takvi prolaze razgradnju intestinalnim enzimima do molekula koje su biorazgradive.

Naime, polifenoli predstavljaju vrlo heterogenu skupinu spojeva, a njihovo osnovno obilježje je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Escarpa i Gonzalez, 2001). Približno 8000 polifenolnih molekula do danas je poznato, a najznačajnije skupine su: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Bravo 1998; Escarpa i Gonzalez, 2001).

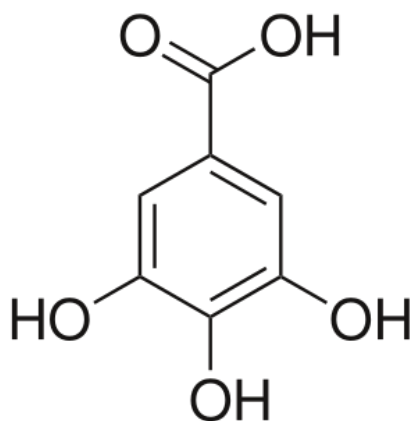
Mnogobrojna biološka djelovanja polifenola eksperimentalno su dokazana, kao što su antioksidativno, antiradikalno, protuupalno, protumikrobno, imunomodulatorno, protualergijsko, protukancerogeno, hipoglikemijsko i dr. (Yon i Baek, 2015; Biesalski, 2007).

1.5.1. Galna kiselina

Galna kiselina (3, 4, 5-trihidroksibenzoična kiselina, GA) (Slika 6) kao polihidroksifenolna sastavnica je široko rasprostranjena u različitim biljkama, voću i hrani, gdje je prisutna ili u slobodnoj formi ili kao sastavnica tanina, nazvanih galotanini. Uočene su različite biološke aktivnosti GA, anti-bakterijske, anti-viralne i anti-upalne. Glavni interes za galnu kiselinu je upravo zbog njezinog antitumorskog djelovanja.

Apoptoza inducirana galnom kiselinom povezana je s oksidativnim stresom uzrokovanim ROS-om, disfunkcijom mitohondrija i povišenom razinom unutarstaničnog Ca^{2+} . Galna kiselina ne pokazuje citotoksični učinak na normalne fibroblaste i endotelne stanice (You i sur., 2010).

Raznolikost substituenata galne kiseline omogućuje dobivanje estera s brojim analogima i značajnim farmakološkim prednostima (Locatelli i sur., 2013).



Slika 6. Struktura galne kiseline

(Preuzeto od:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0d/Gallic_acid.svg/300px-Gallic_acid.svg.png)

Cilj istraživanja

Cilj rada jest istražiti protutumorski učinak galne kiseline na modelu miša nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora na:

- a) rast tumora
- b) angiogenezu
- c) funkcionalnu sposobnost makrofaga
- d) polarizaciju makrofaga
- e) oksidacijski stres

Želimo pronaći poveznicu između:

- 1.) Oksidacijskog stresa, peritonealne angiogeneze i rasta tumora
- 2.) Funkcionalne sposobnosti makrofaga i njihove učinkovitosti na rast tumora i angiogenezu
- 3.) Polarizacije makrofaga i aktivnosti M1 i M2 makrofaga nazočnih u slezeni i ascitesu tumora kroz analizu dušik oksida i aktivnosti arginase 1.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Tumorske stanice

Erlichov ascitesni tumor (EAT) je heterogeni, slabo diferencirani i brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti. Izvorno se javlja kao spontani karcinom mliječne žlijezde u miša. U jetri miševa, nositelja Erlichovog ascitesnog tumora, dolazi do znatnog povećanja lipidne peroksidacije te do smanjenja količine antioksidativnih enzima.

Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) održavali smo serijskim presađivanjem stanica svakih 7 ili 9 dana u obliku ascitesa injicirano intraperitonejski (*ip*) u Swiss albino miševe. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 5 mL fiziološke otopine i lagane masaže trbušne stijenke, napravili smo podužni rez i otvorili peritonejsku šupljinu miša. Pasteurovom pipetom pokupili smo peritonejsku tekućinu s tumorskim stanicama i razrijedili fiziološkom otopinom (0,9 % otopina natrij klorida, Braun) do ciljane koncentracije od $2,5 \times 10^6$ EAT stanica/0,5 mL. Broj živih stanica odredili smo brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Burker-Tiirkovoj komorici. Unos EAT stanica u peritonejsku šupljinu miša predstavlja 0. dan pokusa.

2.1.2. Pokusne životinje

U istraživanju smo koristili Swiss albino miševe uzgojene u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Istraživanje smo proveli na ukupno 60 Swiss albino miševa, podjeljenih na 10 skupina sa po 5 i 7 životinja s obzirom na obradu (Tablica 4). Istraživanje smo proveli prema etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19, 1999) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86- 23).

2.1.3. Galna kiselina (GA)

Kao antioksidans smo koristili galnu kiselinu (Gallic acid, $C_6H_2(OH)_3COOH$, $M_r = 180,16$ g/mol).

2.1.4. Otapalo

Kao otapalo koristili smo fiziološku otopinu; 0,9 % NaCl (Natrijev klorid 0,9 % otopina za infuziju, proizvođača B. Braun Adria d.o.o., Zagreb, HR).

2.1.5. Kemikalije

Glutation reduktaza (enzim, iz pekarskog kvasca), 100-300 U/mg proteina (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); Folin i Ciocalteu's fenol reagens (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); citokrom C iz goveđeg srca 100 mg (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); ksantin oksidaza, Buttermilk 50 U, 1.05 U/mg proteina (Calbiochem, SAD); NADPH tetranatrijeva sol, $M_r = 833,35$ g/mol (Applichem GmbH, Njemačka); DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina), $M_r = 396,36$ g/mol (Fluka, Švicarska); Albumin iz goveđeg seruma, BSA (Sigma-Aldrich, SAD); SDS, natrij dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, SAD); TBA, tiobarbituratna kiselina, $M_r = 144,15$ g/mol (Applichem GmbH, Njemačka); L-glutation reduktaza, $M_r = 307,33$ g/mol (Applichem GmbH, Njemačka); Griess reagent system (Promega, SAD).

2.1.6. Instrumenti

Centrifuga: Centrifuge 5702 (Eppendorf); Mikro 200R (Hettich)

Spektrofotometar: UV-160 (Shimadzu); Libra S22 (Biochrom)

Mikrotitarski čitač: Microplate reader Model 550 (Bio-Rad); iEMS reader MF (Labsystems)

Svjetlosni mikroskop: Nikon Eclipse E600; Olympus Cx21

Kamera za mikroskop: AxioCam ERc 5s (Zeiss)

Program za obradu slike: ZEN 2 (blue edition)

2.2. METODE

2.2.1. Praćenje promjena tjelesne težine

Prije početka izvođenja pokusa kao i tijekom izvođenja pokusa životinje smo pojedinačno označili i izvagali na temelju čega smo ih svrstali u skupine sa sličnom tjelesnom težinom (± 2 g). Na temelju težine životinja za pojedinu skupinu smo odredili količinu pojedinačnih pripravka koje smo davali tijekom pokusa, te je praćena promjena težine tijekom pokusa. Mjerenje tjelesne težine (TT) vršeno je digitalnom vagom.

2.2.2. Obrada životinja

Tumor je izazvan injiciranjem $2,5 \times 10^6$ stanica EAT-a (0. dan pokusa). Obradu životinja s EAT tumorom (Tablica 3) započeli smo 5. dana u progresivnoj fazi rasta EAT *ip* injiciranjem galne kiseline (GA) u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg svaki drugi dan (5, 7, 9, i 11 dana). Nakon 24 sata od završetka obrade životinje smo anestezirali mješavinom Ksilopana (0,5 mL), Narketana (1 mL) i vode (8,5 mL) *ip* 0,1 mL/10 g, te žrtvovali i izdvojili tkivo (jetra, slezena, bubreg i peritonealna ovojnica) i ascites za daljnju analizu. Svaka skupina sadržavala je 7 životinja.

Tablica 3: Pokusne skupine i način obrade galnom kiselinom

Oznaka skupine	Sastav pokusne otopine	Doziranje	Početak	Period obrade
0. Kontrola	0,9 % NaCl	0, 5 mL	5. dan	4x
1. GA 40 mg/kg	Otopina 36 mg galne kiseline na 14 mL 0, 9 %	40 mg/kg	5. dan	4x
2. GA 80 mg/kg	Otopina 36 mg galne kiseline na 7 mL 0, 9 %	80 mg/kg	5. dan	4x

2.2.3. Protutumorska učinkovitost galne kiseline

2.2.3.1. *Praćenje preživljenja životinja*

Pratili smo preživljenje i spontano uginuće životinja nositelja tumora EAT (0-36 dana), ip obrađenih kafeinskom kiselinom (Tablica 3).

2.2.3.2. *Određivanje ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini*

Injicirali smo 3 mL fiziološke otopine u trbušnu šupljinu miševa, a zatim smo izvadili peritonealnu tekućinu za analizu i razrijedili je s fiziološkom otopinom do volumena od 10 mL. Nakon toga smo pomoću Bürker-Türkove komorice izbrojili ukupan broj stanica u peritonealnoj tekućini.

2.2.3.3. *Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine*

Eksperimentalnim životinjama smo 24 sata nakon obrade svih pokusnih skupina uzeli peritonealnu tekućinu i napravili razmaze na predmetnim stakalcima. Zatim smo ih ostavili da se osuše na sobnoj temperaturi. Preparate smo prvo obojili bojom May Grünwald 7 minuta, a zatim Giemsa 15 minuta (1 dio Giemse : 2 dijela vode). Diferencijalnu analizu preparata vršili smo brojenjem limfocita, makrofaga, neutrofila, eozinofila i bazofila na 100 stanica, pod svjetlosnim mikroskopom, na povećanju 400x. Napravili smo po četiri preparata za svaku skupinu.

2.2.4. Učinak galne kiseline na angiogenezu

2.2.4.1. *Priprema histoloških preparata peritonejske ovojnice*

Nakon izolacije stanica iz peritonealne šupljine, izrezali smo dio peritonejske ovojnice, isprali fiziološkom otopinom i fiksirali u 4 % - tnom formaldehidu (10 mL 36 % formaldehida i 90 mL PBS-a). Nakon fiksacije tkivo smo pripremili parafinskom tehnikom i preprati debljine 8 µm obojali korištenjem Merck-ovg Mayer's hemalauna i 0,5 % otopine eozina. Preparate smo histološki pregledali na svjetlosnom mikroskopu CX21 proizvođača Olympus.

2.2.4.2. *Kvantitativno mjerenje prožiljenosti*

Kvantitativno mjerenje prožiljenosti peritonealne ovojnice proveli smo određivanjem prosječne gustoće prožiljenosti peritonealne ovojnice (MVD) u područjima najintenzivnije prokrvljenosti (VS).

Mjerenje smo inapravili na reprezentativnim uzorcima nakon što smo pregledali sve histološke preparate prema Weidnerovim preporukama o veličini vidnog polja i načinu brojenja:

- mjesta najveće gustoće krvnih žila („hot spots“) tražili smo na najmanjem povećanju (10x)
- brojenje pojedinačnih krvnih žila proveli smo na povećanju (400x) uz veličinu vidnog polja od 0,12 do 1 mm²
- u rezultate smo ubrajali ne samo kompletne krvne žile već i tračke endotelnih stanica i pojedinačne endotelne stanice
- lumen krvnih žila nije potreban kao ni prisustvo eritrocita
- brojanje su provela dva ispitivača

2.2.5. Polarizacija makrofaga slezene i makrofaga nazočnih u ascitesu

2.2.5.1. *Priprema radnih otopina za analizu NO*

2.2.5.1.1. *Izolacija i stimulacija makrofaga slezene s LPS-om*

Slezenu smo izvagali i propasirali kroz mrežicu sa špatulom, te s mrežice isprali stanice s fiziološkom otopinom (do 5 mL). Nakon toga, kako bi razbili stanice, staničnu suspenziju smo par puta provukli kroz iglu i špricu. Propasirane stanice smo prebacili u epruvete i sve epruvete izjednačili do 6 mL s fiziološkom otopinom. U laminaru (sterilno) smo sterilne epruvete sa čepom napunili sa 3 mL limfoprepa. Potom smo pod kutem od 180° na limfoprep nasložili 6 mL stanične suspenzije i centrifugirali na 2200 rpm/20 min/+4 °C. Nakon centrifugiranja je nastao bijeli prsten, iz kojeg smo pipetom pokupili sloj stanica leukocita i prebacili u novu epruvetu, te izjednačili volumen u svim epruvetama. Nakon centrifugiranja na 10000 rpm/15 min/+4 °C uklonili smo nadtalog. Preostali talog smo resuspendirali u 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a po jažici (pločice s 24 jažice). Sve smo inkubirali 1 sat na 37 °C/5 % CO₂. Medij smo ukloili, jažice isprali s fiziološkom otopinom i potom ujažice je dodali 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a i 0,1 µg/mL LPS-a. Inkubirali smo 24 sata na 37 °C/5 % CO₂. Nakon inkubacije sav nadtalog smo prebacili u eppendorf epice i pohranili na -20 °C, za NO analizu.

2.2.5.1.2. *Izolacija i stimulacija makrofaga ascitesa s LPS-om*

Iz obrađenih životinja i kontrole uzeli smo 1 mL ascitesa i inkubirali 3 sata na 37 °C/5 % CO₂, u pločicama s 24 jažice. Potom smo uklonili nadtalog s tumorskih stanica (na dnu su ostali adherirani makrofagi) i jažice smo isprali s fiziološkom otopinom. Dodali smo 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a i 0,1 µg/mL LPS-a, te inkubirali 24 sata na 37 °C/5 % CO₂. Nakon 24 sata pokupili smo nadtalog i pohranili na -20 °C za NO analizu. Po jažici je dodano 500 µL 0,025 % Tripsina (podizanje adheriranih makrofaga) i inkubirano 3 minute. Pod svjetlosnim mikroskopom je provjereno da li su se stanice odvojile od podloge.

Tripsin je neutraliziran dodavanjem 1 mL DMED medija s 10 % FBS-om, i stanice su dodatno odvojene od podloge pomoću strugača, te pohranjene na -20 °C za NO analizu.

2.2.5.1.3. *Izolacija makrofaga ascitesa bez stimulacije s LPS-om*

Preostali ascites obrađenih životinja i kontrole izjednačen s fiziološkom otopinom po volumenu inkubirali smo 3 sata na 37 °C/5 % CO₂ u pločicama sa 6 jažica. Nakon inkubacije nadtalog smo centrifugirali na 2200 rpm/10 min/+4 °C. Dobiveni nadtalog je pohranjen na -20 °C za analizu NO. Po jažici smo dodali 500 µL 0,025 % Tripsina (podizanje adheriranih makrofaga) i inkubirali 3 minute. Pod svjetlosnim mikroskopom provjerili smo da li su se stanice odvojile od podloge te neutralizirali Tripsin dodavanjem 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-om, i stanice su dodatno odvojene od podloge pomoću strugača, te pohranjene na -20 °C za analizu NO.

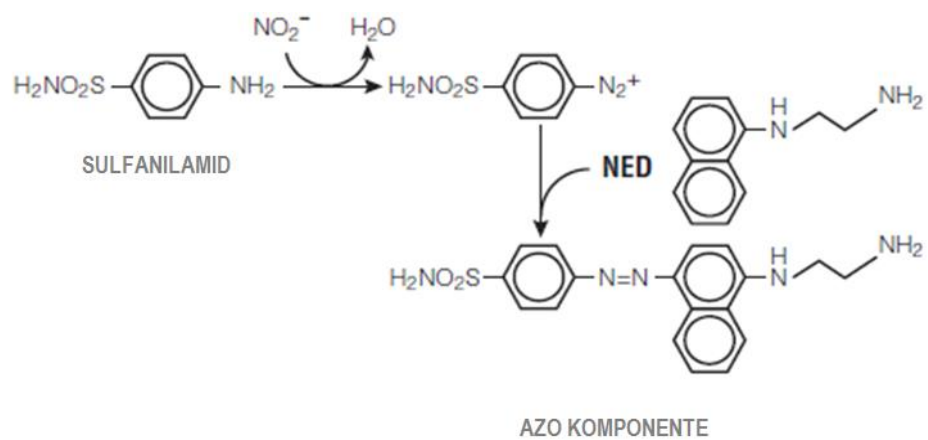
2.2.5.2. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

Ova analiza se temelji na reakciji diazotacije koju je prvi opisao Griess 1879. Brojne stanice sisavaca sintetiziraju dušikov oksid oksidacijom L-arginina pomoću enzima dušik oksid sintetaze. U uvjetima *in vitro* dušikov oksid se brzo metabolizira u stabilne produkte, nitrite (NO_2^-) ili nitrate (NO_3^-), ovisno oksidira li se molekularnim kisikom ili superoksidnim anionom, i kao takav se izlučuje izvan stanice u hranjivu podlogu (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Sinteza dušikovog oksida može se indirektno odrediti spektrofotometrijski Griessovom metodom, mjereći nitrite i nitrate akumulirane u tekućoj hranjivoj podlozi u kojoj rastu stanice.

Mi smo koristili kit *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD), koji za analizu NO_2^- koristi 1% sulfanilamid pripremljen u 5 % fosfatnoj kiselini i 0,1 % N-1- naftiletilenediamin dihidroklorid (NED).

U mikrotitarsku ploču smo stavili 50 μL uzorka u triplikatu, potom smo dodali 50 μL sulfanilamid otopine i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon prve inkubacije smo dodali 50 μL NED otopine i opet inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon druge inkubacije (ružičasto obojenje uzorka) smo očitali apsorbanciju na 540 nm na uređaju Labsystems iEMS Reader MF. Kao standard upotrijebili smo 0,1M natrijev nitrit u koncentracijama od 0 do 100 μM . Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nitrata određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunali smo koncentraciju NO_2^- u uzorcima. Koncentracija NO_2^- izražena je kao $\mu\text{M}/\mu\text{L}$.



Slika 7. Kemijska reakcija nastala mjerenjem NO_2^- koristeći Griess reagens sustav

(Preuzeto od: www.promega.com)

2.2.6. Određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga iz peritonealne tekućine

Funkcionalnu aktivnost makrofaga odredili smo 24 sata nakon deset dana obrade pokusnih životinja i kontrole. Iz svih skupina smo uzeli peritonealnu tekućinu za određivanje funkcionalne aktivnosti makrofaga i napravili razmaze na predmetnim stakalcima (po 4 stakalca za svaku skupinu) te osušili na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Zatim smo fosfatnim puferom (PBS) isprali neadherirane stanice, a adherirane stanice koje su ostale na stakalcima smo inkubirali 1 sat u hranjivom mediju 199 koji sadrži 10 nM HEPES-a na temperaturi 37 °C. Poslije inkubacije uklonili smo hranjivi medij, a preparate fiksirali 2,5 % -tnim glutaraldehidom. Zatim smo preparate obojili 5 % -tnom otopinom Giemse. Svjetlosnim mikroskopom, na povećanju 400x, vršili smo analizu preparata. Brojali smo 200 makrofaga po svakom preparatu i određivali udio aktiviranih stanica u odnosu na udio neaktivnih stanica.

2.2.7. Određivanje koncentracije parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

2.2.7.1. *Izolacija i priprema tkiva*

Izolirana tkiva (bubrezi, jetra i slezena) smo pohranili na -80 °C do pripreme za analizu. Tjedan dana nakon pohrane, odvagali smo 30-45 mg svakog organa u eppendorf epruvetu, dodali fosfatni pufer (PBS) u omjeru 1:10 i uzorke homogenizirali ultrazvučnim homogenizatorom. Dobivene homogenate smo centrifugirali na 15000 okretaja kroz 15 min na 4 °C, nakon centrifugiranja odvojili nadtalog, razrijedili ga 10 puta (100 µL nadtaloga i 900 µL fosfatnog pufera) i sve uzorke pohranili na -20 °C do analize.

2.2.7.2. *Određivanje proteina metodom po Lowry-u*

Količinu proteina u tkivima odredili smo metodom po Lowry-u (1951). Ova metoda temelji se na činjenici da u lužnatim uvjetima divalentni ion bakra tvori kompleks s peptidnim vezama. Pritom se reducira u monovalentni ion bakra. Cu^+ i ostaci tirozina, triptofana i cisteina iz proteina reagiraju s Folinovim reagensom, pri čemu nastaje nestabilni produkt, a on se zatim reducira do molibden/volfram plavog ($\lambda = 600 \text{ nm}$).

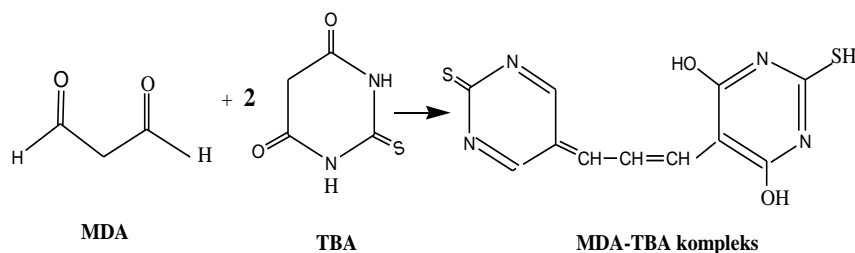
Metodom po Lowry-u odredili smo proteine u ascitesu, bubrezima, jetri i slezeni miša. Sve je rađeno u duplikatima. Uzorci su razrijeđeni u PBS-u: ascites, bubreg i slezena 50 puta, a jetra 20 puta. U epruvete smo dodali po 100 μL razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D i inkubirali 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodali smo 200 μL otopine E nakon čega smo snažno vorteksirali i inkubirali 30 min na sobnoj temperaturi. Količinu proteina odredili smo na spektrofotometru mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard upotrijebili smo albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) u koncentracijama od 2 mg/mL prema manjim koncentracijama (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 i 0 mg/mL). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentracije BSA odredili smo nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunali smo koncentraciju proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli: $c = ((A_{\text{uzorka}} - b_{\text{st.krivulje}}) / \text{nagib pravca st.krivulje}) \times \text{razrijeđenje}$. Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL.

Tablica 4. Priprema otopina za određivanje proteina po Lowry-u

Otopina D	<p>Pomiješati otopine u omjeru 48:1:1 (A:B:C)</p> <p>A: 2 % (w/v) Na_2CO_3 u 0,1M NaOH</p> <p>9,6 g Na_2CO_3 + 480 mL 0,1M NaOH</p> <p>B: 1 % (w/v) natrij-kalij tartarat u dH₂O</p> <p>0,1 g natrij-kalij tartarat + 10mL dH₂O</p> <p>C: 0,5 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u dH₂O</p> <p>0,05 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 10 mL dH₂O</p>
Otopina E	<p>Pomiješati Folin i Ciocalteu's fenol reagens i dH₂O u omjeru 2:1</p>

2.2.7.3. Mjerenje količine lipidne peroksidacije

Količinu lipidne peroksidacije odredili smo modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. 2007. U metodi se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Metoda koja se najčešće koristi za određivanje koncentracije MDA u biološkom uzorku je derivatizacija MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i nastaje MDA-(TBA)₂ kompleks. Reakcija se odvija u kiselim uvjetima i na visokoj temperaturi pri čemu nastaje crveni fluorescentni derivat MDA-(TBA)₂ čija koncentracija se može izmjeriti spektrofotometrijski pri valnoj duljini 532 nm. Princip ove metode se zasniva na sljedećoj reakciji:



Slika 8. Mehanizam reakcije TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom

(Preuzeto od: <http://www.supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/9203>)

U eppendorf epruvetu dodali smo 100 μ L homogenog uzorka i 1,6 mL reagensa A. Otopinu smo zatim stavili u vodenu kupelj na 95 °C na 60 minuta. Nakon toga otopinu smo naglo ohladili na ledu prilikom čega su se nastale folikule slegnule na dno. Nadtalog smo odvojili i izmjerili apsorbanciju pri 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izračunali smo prema sljedećoj formuli:

$c = (A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese}) / (\epsilon \times V_{uzorka} \times C_{proteina\ uzorka})$, te je izražena kao nmol MDA po mg proteina.

Tablica 5. Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

8,1% SDS	0,81 g SDS-a u 10 mL dH ₂ O
20% octena kiselina	20 mL 99,5 % octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH ₂ O i podesi pH=3,5 te nadopuni dH ₂ O do 100 mL
0,8% TBA	0,8 g TBA u 40 mL dH ₂ O uz lagano zagrijavanje. Nakon što se otopi dodaje se 500 µL 5M NaOH te se nadopuni s dH ₂ O do 100 mL.
Otopina A	100 µL 8,1 % SDS + 750 µL 20 % octene kiseline (pH = 3,5) + 750 µL 0,81 % TBA

2.2.7.4. *Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze*

Aktivnost katalaze odredili smo spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984). U toj metodi aktivnost katalaze određuje se kao količina potrošenog H_2O_2 .

U reakcijsku smjesu u kivetu ukupnog volumena 1 mL dodali smo 980 μL 10 mM H_2O_2 , a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je uzorak odgovarajućeg razrijeđenja. Nakon toga na spektrofotometru mjerili smo smanjenje količine H_2O_2 pri 240 nm tijekom jedne minute. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H_2O_2 ($\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) prema formuli: $c = (A_{\text{uzorka}} / (\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times l)) \times \text{razrijeđenje}$, gdje je l jednak putu koji zraka svijetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm. Rezultat je izražen kao U/mg proteina što odgovara μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina.

2.2.7.5. *Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)*

Koncentraciju ukupnog glutationa odredili smo prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) koja apsorbira pri valnoj duljini 405-414 nm. Osim TNB, stvara se i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanak TNB proporcionalna je recilirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Koncentracija ukupnog GSH mjeri se u mikrotitarskoj pločici. U jednu jažicu dodali smo 20 μL uzorka razrijeđenog 40 puta, 40 μL 0,035 M HCl i 40 μL 10 mM DTNB, te mjerili apsorbanciju na valnoj duljini od 415 nm. Zatim smo dodali 100 μL otopine GR i NADPH te mjerili se apsorbanciju tijekom 5 min. Priprema navedenih otopina prikazana je u Tablici 6. Za standard koristili smo koncentraciju reduciranog GSH (0-100 μM).

Nacrtani su pravci za sve standarde kao promjena apsorbancije u vremenu. Očitani su nagibi pravaca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema sljedećoj formuli:

$$c = ((\text{nagib pravca uzorka} - \text{nagib pravca slijepe probe}) / \text{nagib pravca standarda}) \times \text{razrijeđenje}.$$

Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao μM GSH po mL proteina.

Tablica 6. Priprema otopine za određivanje koncentracije GSH

0,5 M pufer PBS	17 mL 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ i (3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ i dH_2O do 17 mL) 183 mL 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (65,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ i dH_2O do 183mL)
0,5 M EDTA	37,2g EDTA u 200 mL dH_2O
0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA	200 mL 0,5M PBS + 200 mL 0,5M EDTA
0,035 M HCl	7 mL 0,1 HCl u dH_2O do 200 mL
10 mM DTNB	20 mg DTNB i 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 5 mL
0,8 mM NADPH	6,67 mg NADPH i 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 10 mL
Mješavina GR	20 μL GR (50 U/mL) u 9980 μL 0,8 mM NADPH

2.2.7.6. Mjerenje enzimске aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određena je prema metodi po Flohé i Ötting (1971). Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

U ovoj metodi korištene su dvije slijepe probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 7) te je apsorbancija u spektrofotometru mjerena na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze. U kivetu je dodano redom: 25 μL dH_2O , 1,45 mL otopine A i 15-30 μL ksantin oksidaze (0,8 U/mL) (Tablica 2). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja mjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti oko 0,025 U/min. U ovom slučaju volumen XOD koji je odgovarao bio je 25 – 30 μL . Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, analizirali smo uzorke. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH_2O dodano je 25 μL uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Enzimska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze koja se računa prema formuli: $\% \text{ inhibicije} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{slijepa proba}}) \times 100$. Enzimska aktivnost SOD računa se prema formuli: $\text{aktivnost SOD} = 10^{((\% \text{ inhibicije} + 12,757) / 30,932)}$. Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina.

Tablica 7. Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD

50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 50 mL dH_2O) i 183 mL (5,678 g Na_2HPO_4 u 200 mL dH_2O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mM citokroma C (29 mg citokroma C u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
Reakcijska otopina B XOD (aktivnost 0,8 U/mL)	40 μL ksantin oksidaze i 960 μL dH_2O

2.2.8. Određivanje koncentracije arginaze u uzorcima

Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije arginaze u uzorcima proveli smo na način da smo 25 μL uzorka prebacili u epice od 2 mL i dodali 100 μL 0,1 % Triton- X 100. Sve zajedno smo kratko vorteksirali, a zatim 30 minuta inkubirali pri sobnoj temperaturi na treskalici. Nakon inkubacije dodali smo 100 μL Tris- HCl 50 mM (pH= 7,5). Na 100 μL staničnog lizata dodali smo 10 μL MnCl_2 te kratko vorteksirali. Uzorke smo inkubirali u vodenj kupelji 10 minuta pri temperaturi od 55 °C. Stalak s uzorcima zaštitili smo od svjetlosti. 100 μL 0,5 M L-Arginina (pH=9,7) dodali smo uzorcima nakon inkubacije i kratko vorteksirali, te inkubirali 60 min pri temperaturi od 37 °C u vodenj kupelji. Nakon inkubacije dodali smo 800 μL H_2SO_4 (96%): H_3PO_4 (85%): H_2O =1:3:7 te kratko vorteksirali. Nakon vorteksiranja dodali smo 50 μL α -ISPF otopljenog u 100 % EtOH. Ponovno smo sve zajedno vorteksirali, a nakon toga uzorke smo inkubirali u vodenj kupelji 30 min pri temperaturi od 95 °C. Uzorke zaštićene od svjetla, hladili smo 10 min. Koncentraciju arginate odredili smo spektrofotometrijski na valnoj duljini od 540 nm. Nakon zadnje inkubacija uočena je promjena boje uzoraka u ružičasto.

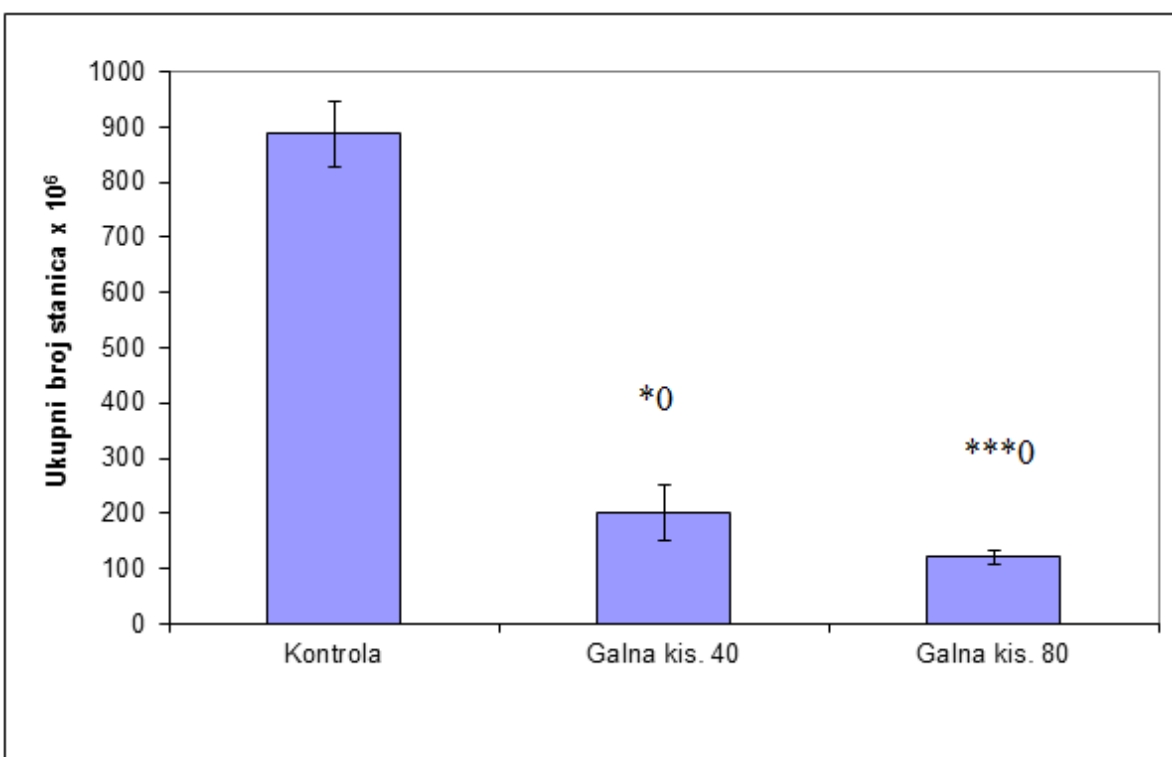
2.3. Statistička obrada podataka

Dobivene rezultate smo obradili Student t -testom. Rezultate smo dobili iz najmanje 2 ili 3 pokusa te izrazili kao srednju vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Razlike srednjih vrijednosti smatraju se značajnima ako je P manji od 0,05.

3. REZULTATI

3.1. Ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini

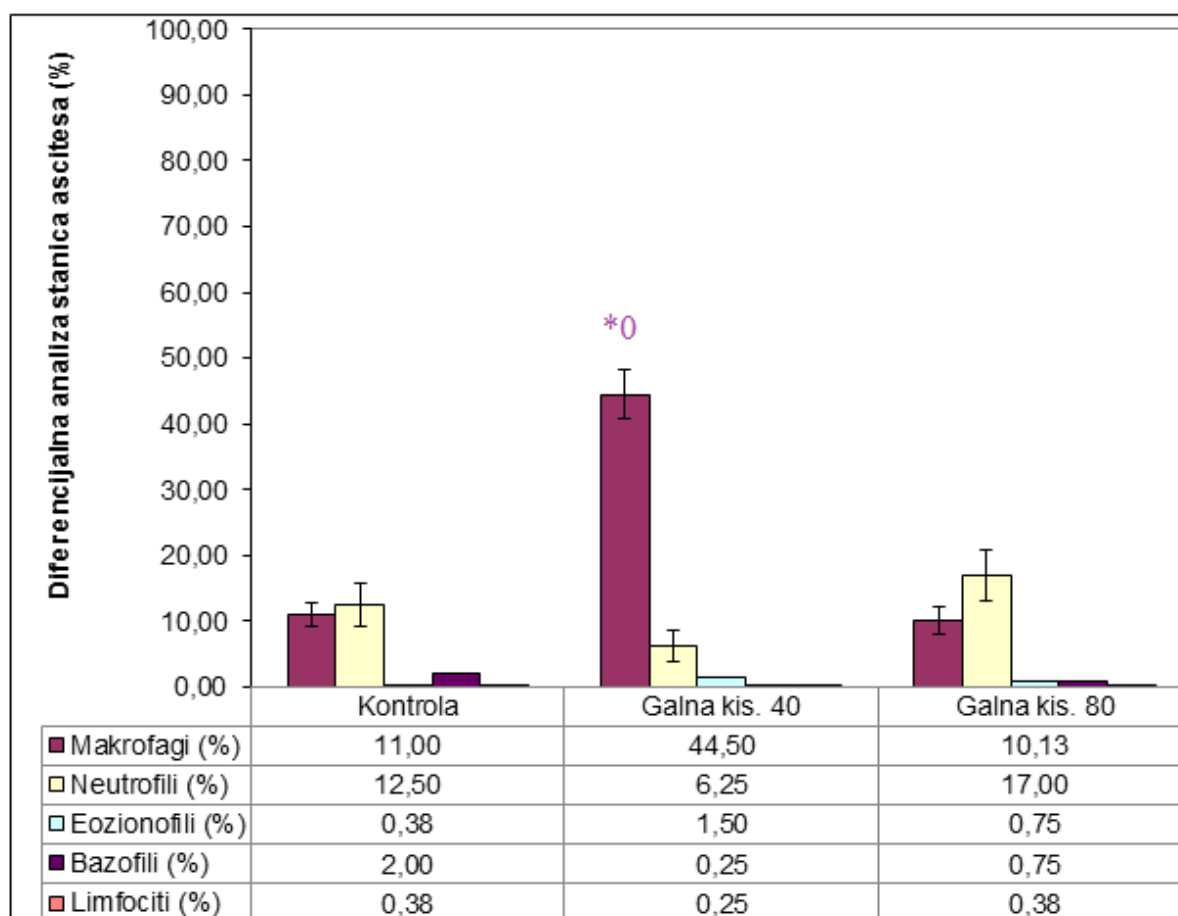
Rezultati određivanja ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini (Slika 9) ukazuju na statistički značajno manji ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini kod obrade s GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) i GA 80 mg/kg ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolu.



Slika 9. Ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

3.2. Diferencijalna analiza stanica ascitesa iz peritonealne tekućine

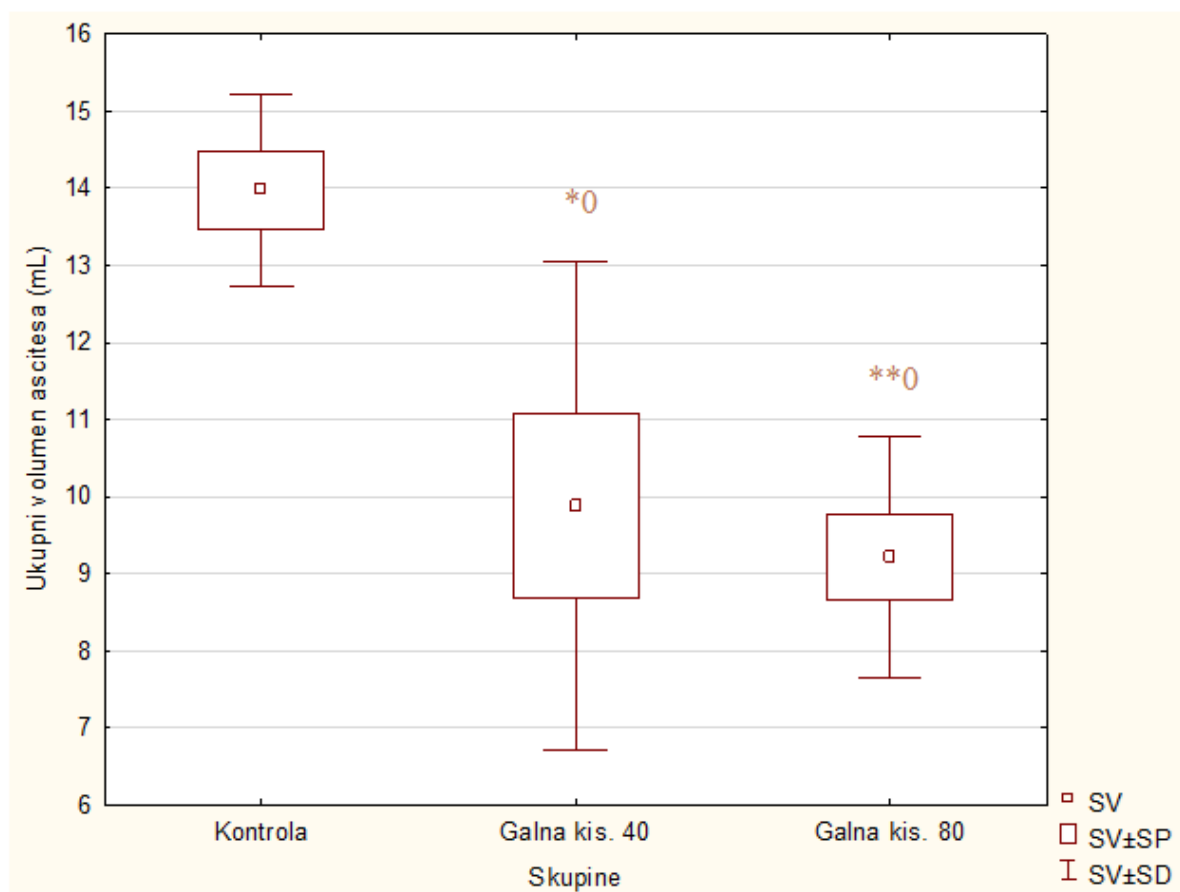
Rezultati diferencijalne analize stanica ascitesa iz peritonealne tekućine (Slika 10) ukazuju na statistički značajno ($P < 0,05$) veći postotak makrofaga kod obrade GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu. Kod obrade GA 80 mg/kg nije uočena statistička značajnost u odnosu na kontrolu.



Slika 10. Diferencijalna analiza stanica iz peritonealne tekućine miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu ($*P < 0,05$).

3.3. Ukupni volumen ascitesa u peritonealnoj tekućini

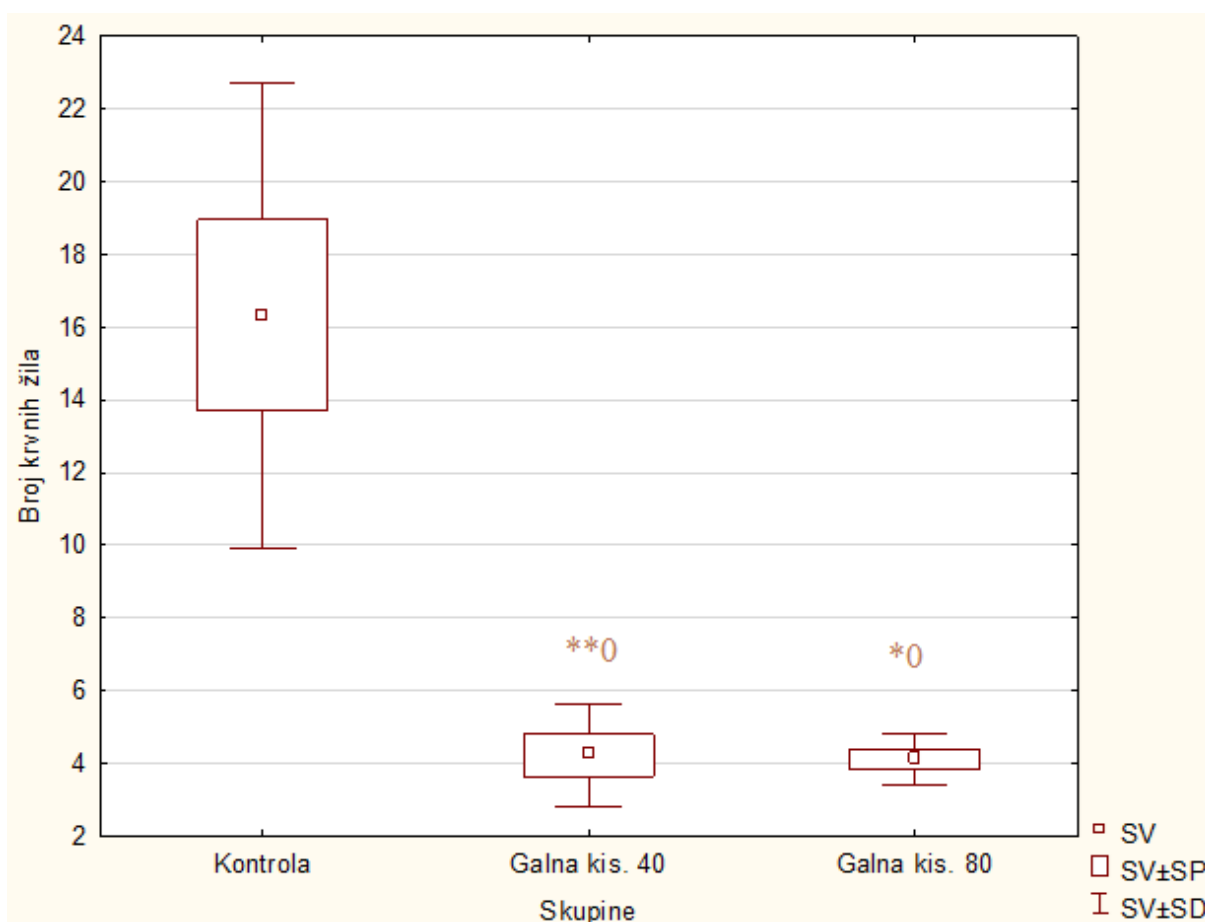
Rezultati određivanja ukupnog ascitesa u peritonealnoj šupljini (Slika 11) ukazuju na statistički značajno manji ukupni volumen ascitesa u peritonealnoj šupljini kod obrade s GA 40 mg/kg ($P < 0,05$) i GA 80 mg/kg ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolu.



Slika 11. Ukupni volumen ascitesa u peritonealnoj šupljini miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=7) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

3.4. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti

Rezultati kvantitativnog mjerenja prožiljenosti ukazuju da je srednja vrijednost broja krvnih žila u obrađenim skupinama s GA statistički značajno manja u odnosu na kontrolu (Slika 12), gdje je: $P < 0,01$ za skupinu GA 40 mg/kg; $P < 0,05$ za skupinu GA 80 mg/kg.

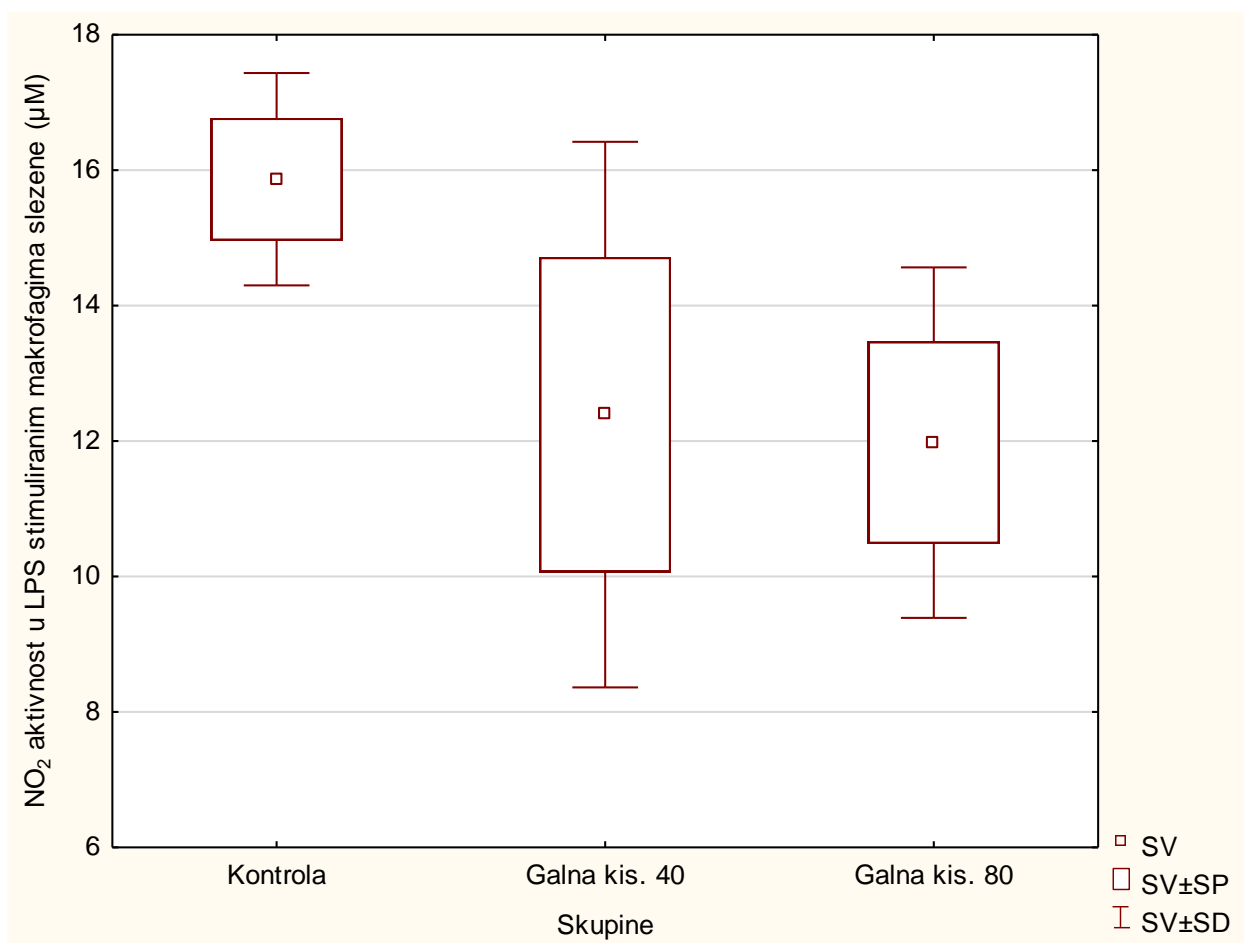


Slika 12. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

3.5. Rezultati mjerenja dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

3.5.1. Razina NO iz LPS-om stimuliranih makrofaga slezene

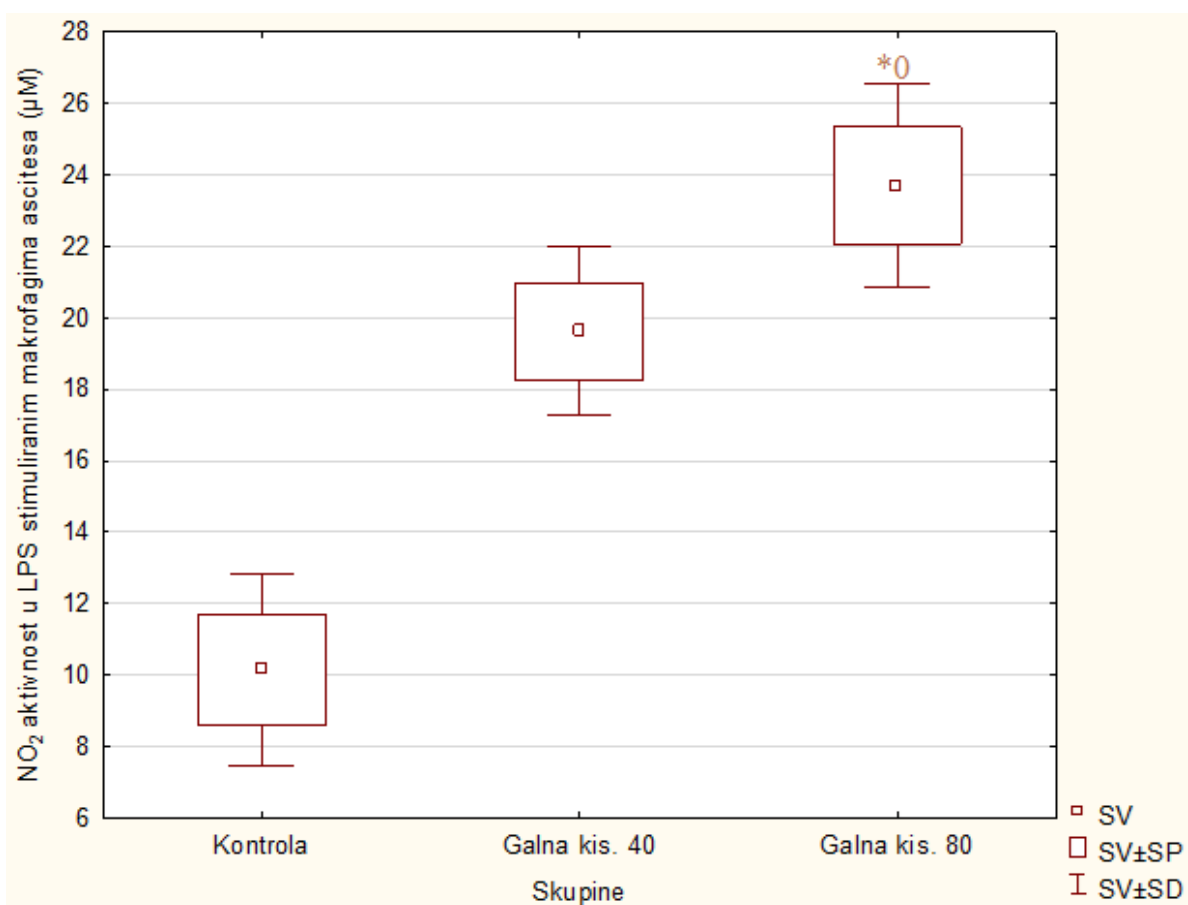
Rezultati određivanja aktivnosti NO u LPS-om stimuliranim makrofagima slezene (Slika 13) ne pokazuju statističku značajnost ($P < 0,05$) kod obrađivanih skupina u odnosu na kontrolu.



Slika 13. Određivanje koncentracije NO u LPS-om stimuliranim makrofagima slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) su obrađeni *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD.

3.5.2. Razina NO iz LPS-om stimuliranih makrofaga ascitesa

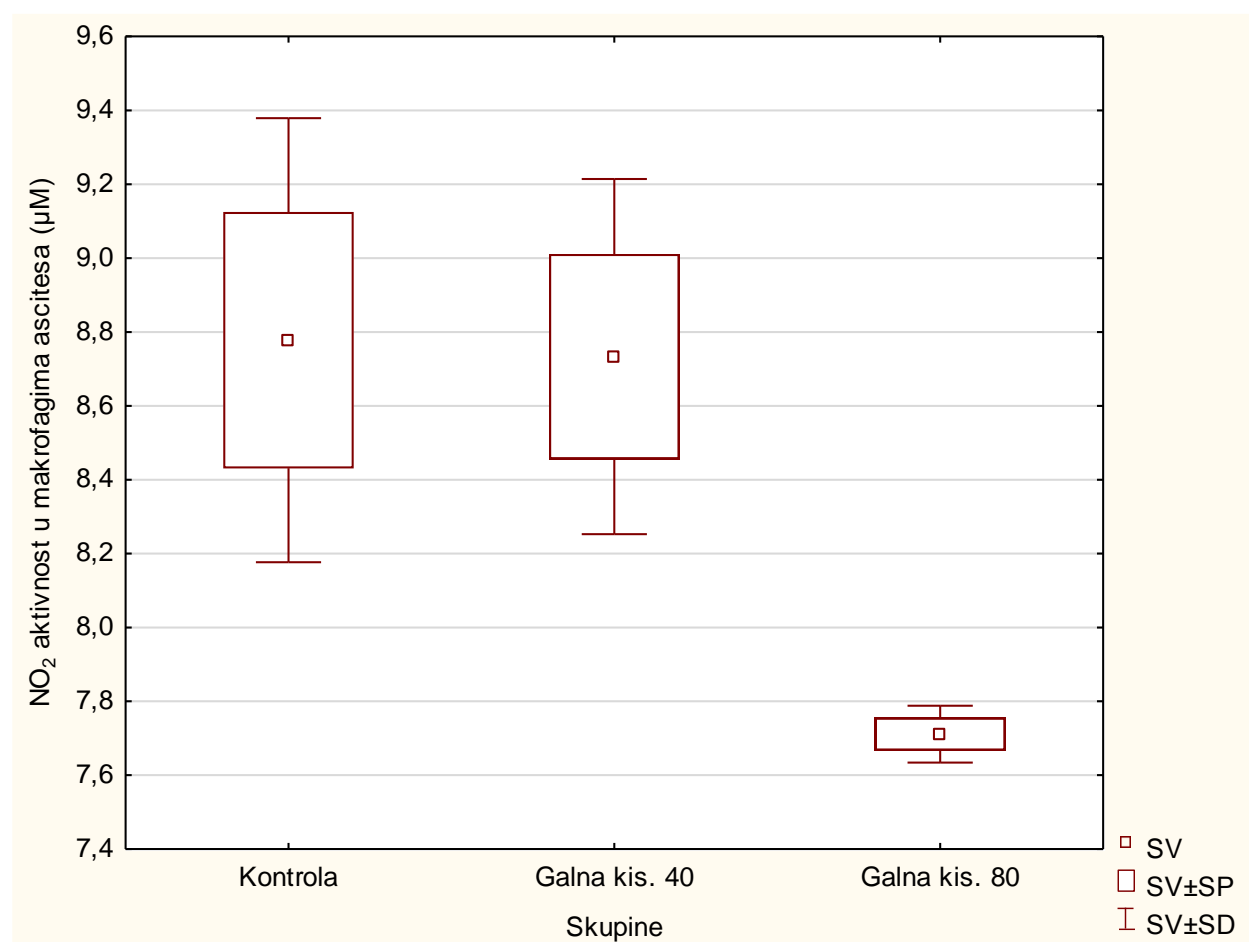
Rezultati određivanja aktivnosti NO u LPS-om stimuliranim makrofagima ascitesa (Slika 14) ukazuju na statistički značajno ($P < 0,05$) povećanu aktivnost NO kod obrade s GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu. Kod obrade s GA 40 mg/kg uočena je povećana aktivnost NO, ali bez statističke značajnosti ($P > 0,05$) u odnosu na kontrolu.



Slika 14. Određivanje aktivnosti NO u LPS-om stimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) su obrađeni *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu ($*P < 0,05$).

3.5.3. Razina NO iz LPS-om nestimuliranih makrofaga acitesa

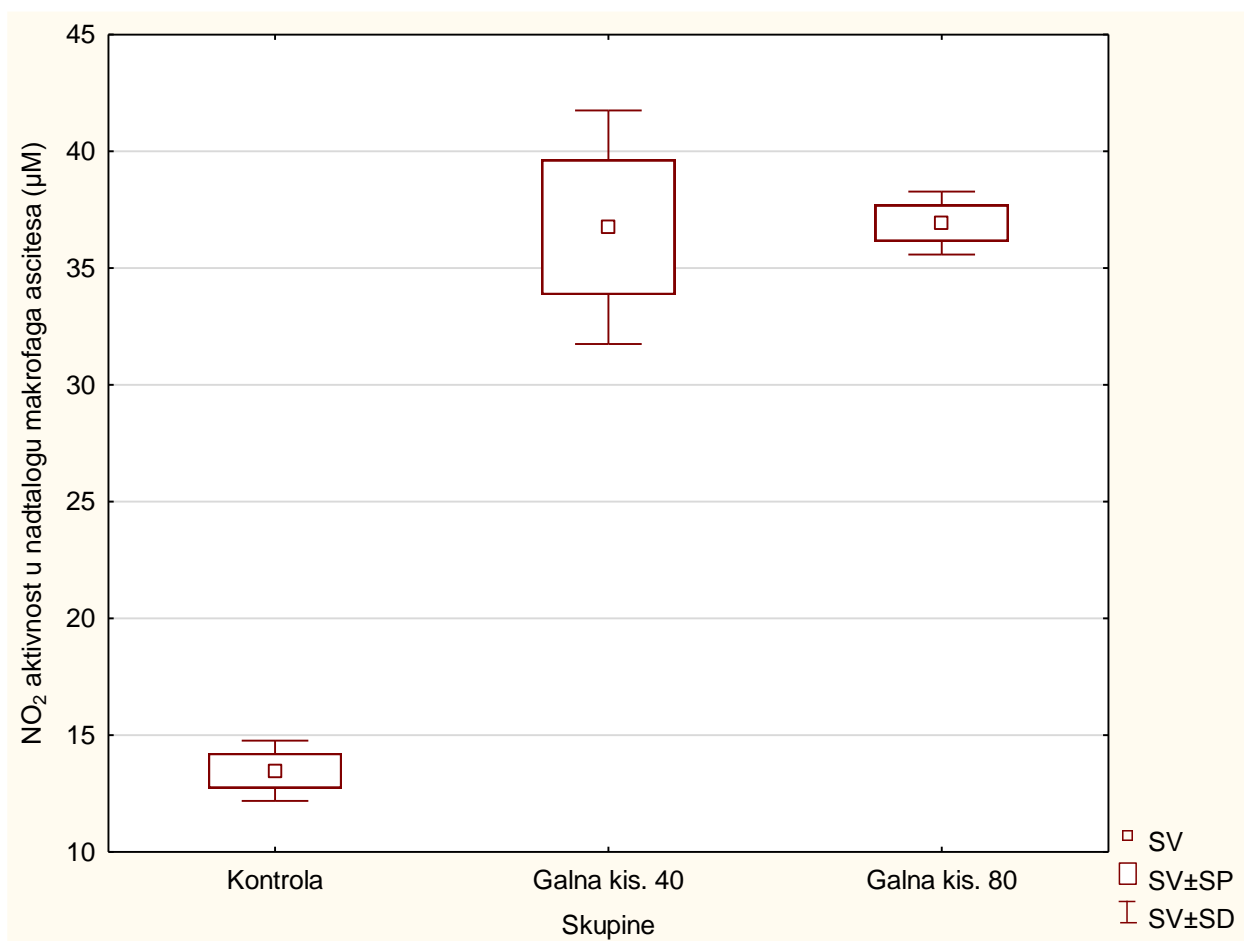
Rezultati određivanja aktivnosti NO u makrofagima ascitesa (Slika 15) ne pokazuju statističku značajnost ($P < 0,05$) kod obrađivanih skupina u odnosu na kontrolu.



Slika 15. Određivanje aktivnosti NO u nestimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) su obrađeni *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD.

3.5.4. Razina NO iz nadtaloga LPS-om nestimuliranih makrofaga ascitesa

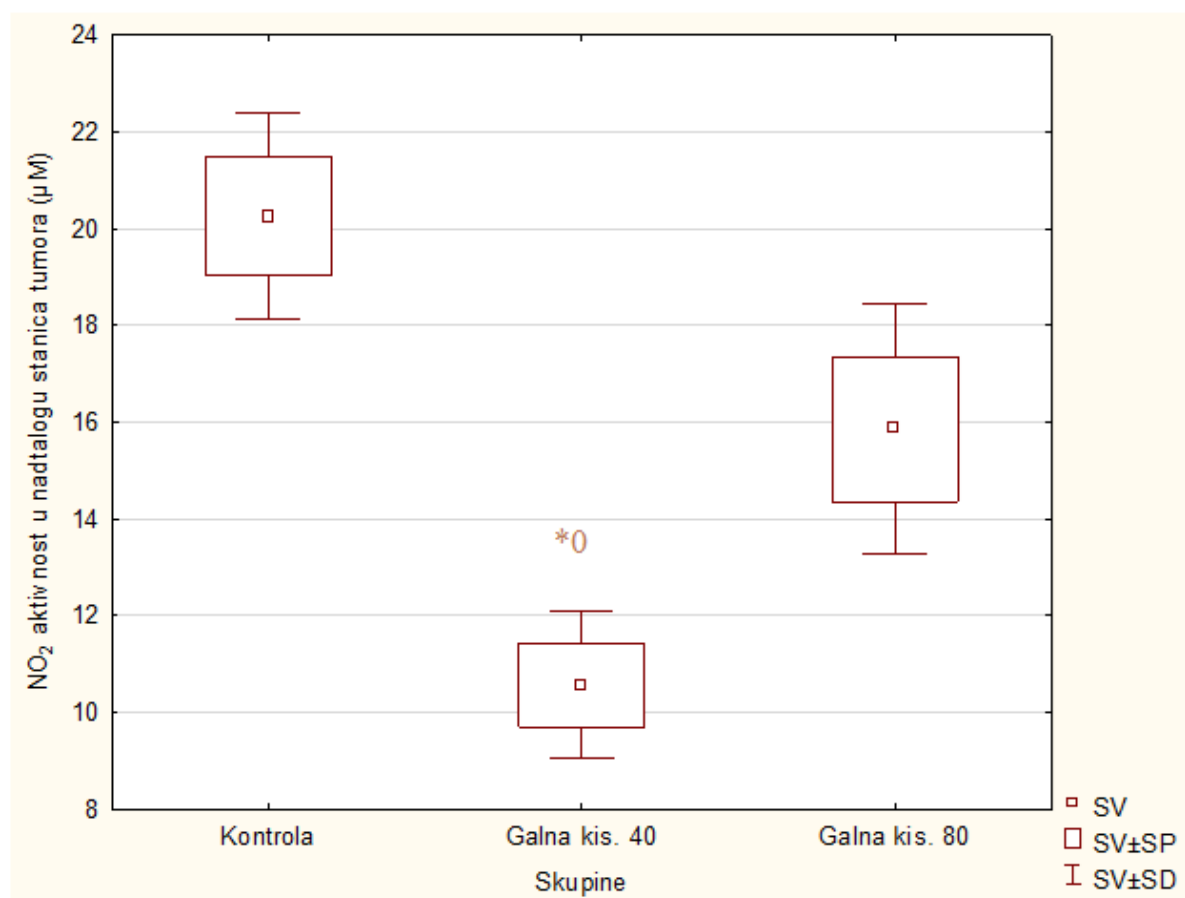
Rezultati određivanja aktivnosti NO u nadtalogu makrofaga ascitesa (Slika 16) ne pokazuju statističku značajnost ($P < 0,05$) kod obrađivanih skupina u odnosu na kontrolu.



Slika 16. Određivanje aktivnosti NO u nadtalogu makrofaga ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD.

3.5.5. Razina NO iz nadtaloga stanica tumora

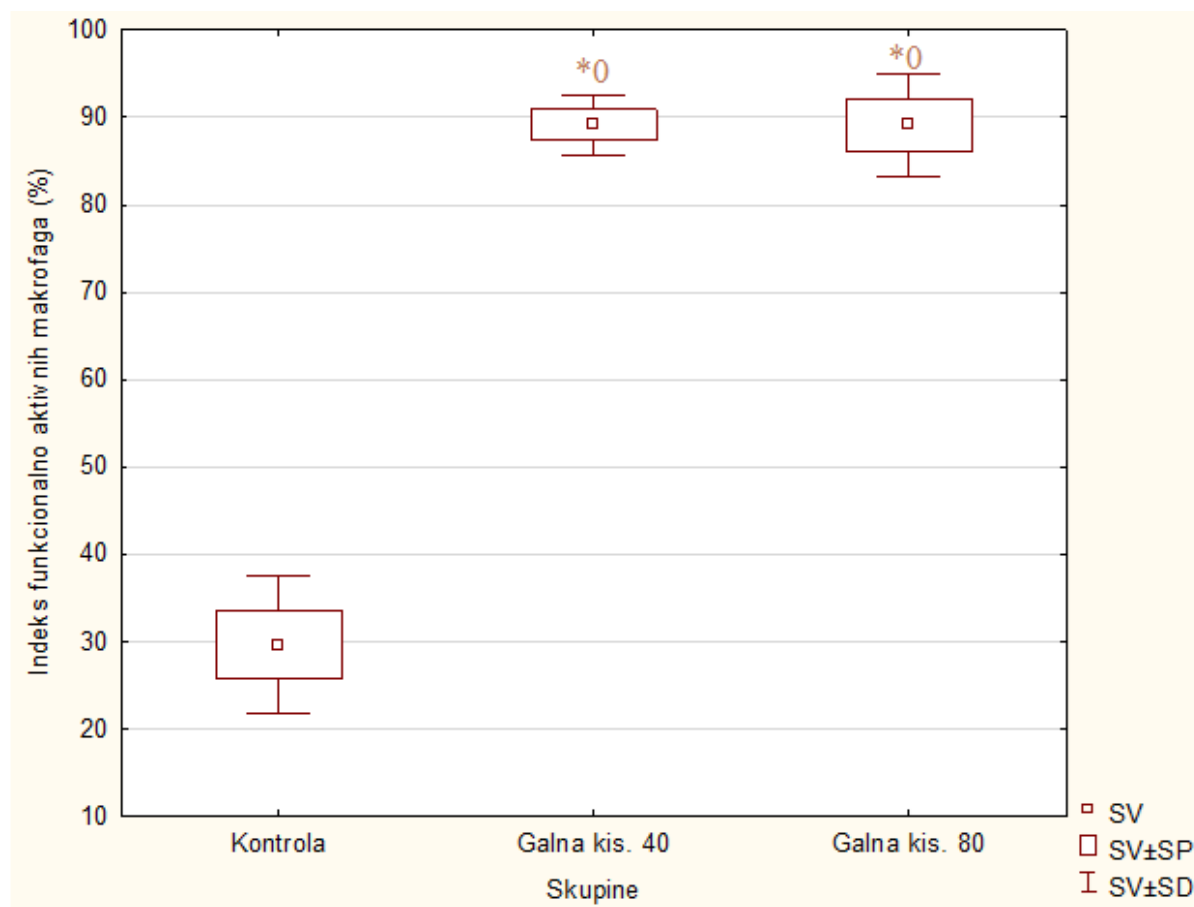
Rezultati određivanja aktivnosti NO u nadtalogu stanica tumora (Slika 17) ukazuju na statistički značajno ($P < 0,05$) smanjenu aktivnost NO kod obrade s GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu. Kod obrade s GA 80 mg/kg nije uočena statistička značajnost ($P > 0,05$) u odnosu na kontrolu.



Slika 17. Određivanje aktivnosti NO u nadtalogu stanica tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu ($*P < 0,05$).

3.6. Funkcionalna aktivnost makrofaga iz peritonealne tekućine

Rezultati izračuna indeksa funkcionalno aktivnih makrofaga (Slika 18) ukazuju na statistički značajno ($P < 0,05$) veći indeks funkcionalno aktivnih makrofaga kod obrade s GA 40 mg/kg i GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu.

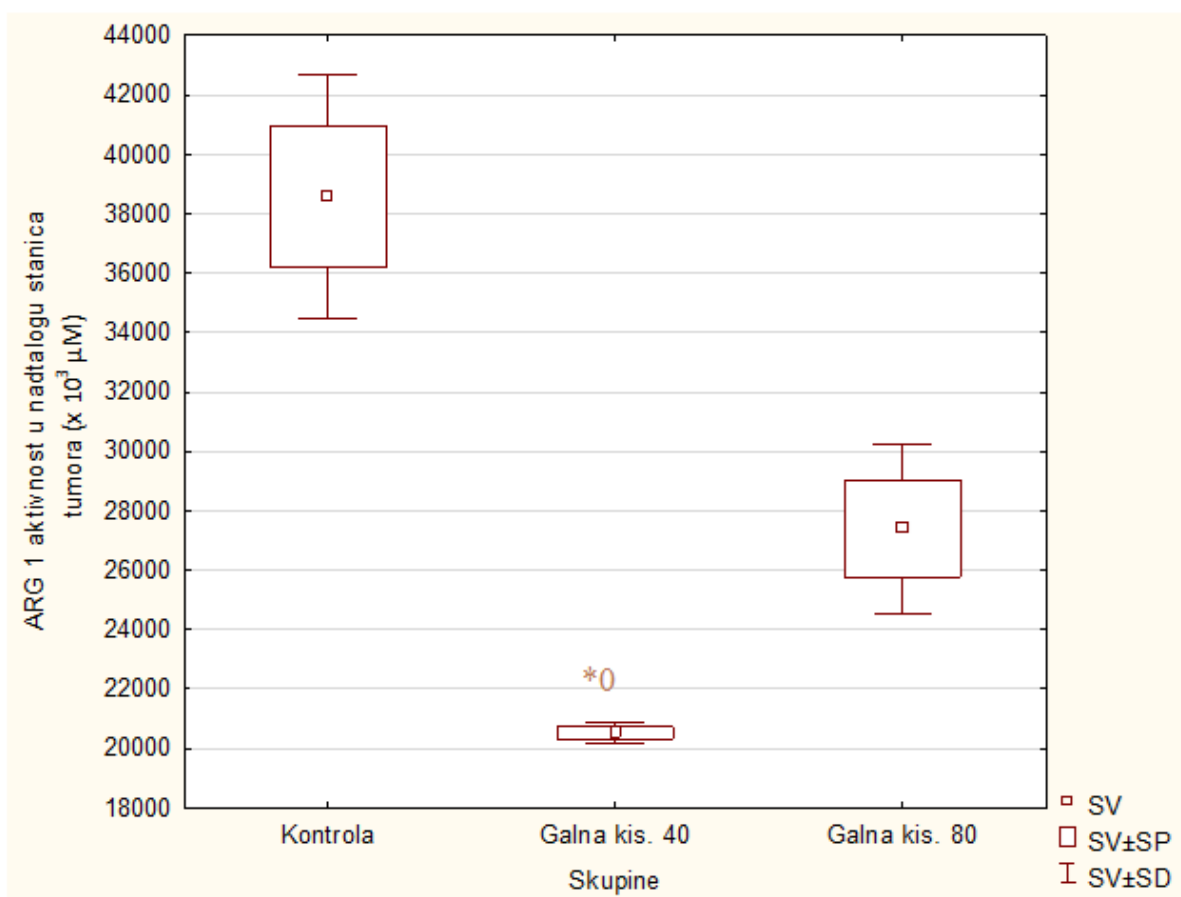


Slika 18. Indeks funkcionalno aktivnih makrofaga miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Indeks funkcionalno aktivnih makrofaga (SI, engl. *Macrophages spreading index*) odredili smo prema formuli: $SI (\%) = \text{broj aktiviranih makrofaga} \times 100 \text{ stanica} / 200$. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu ($*P < 0,05$).

3.7. Rezultati mjerenja aktivnosti ARG 1

3.7.1. Određivanje aktivnosti ARG 1 u nadatalogu stanica miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom

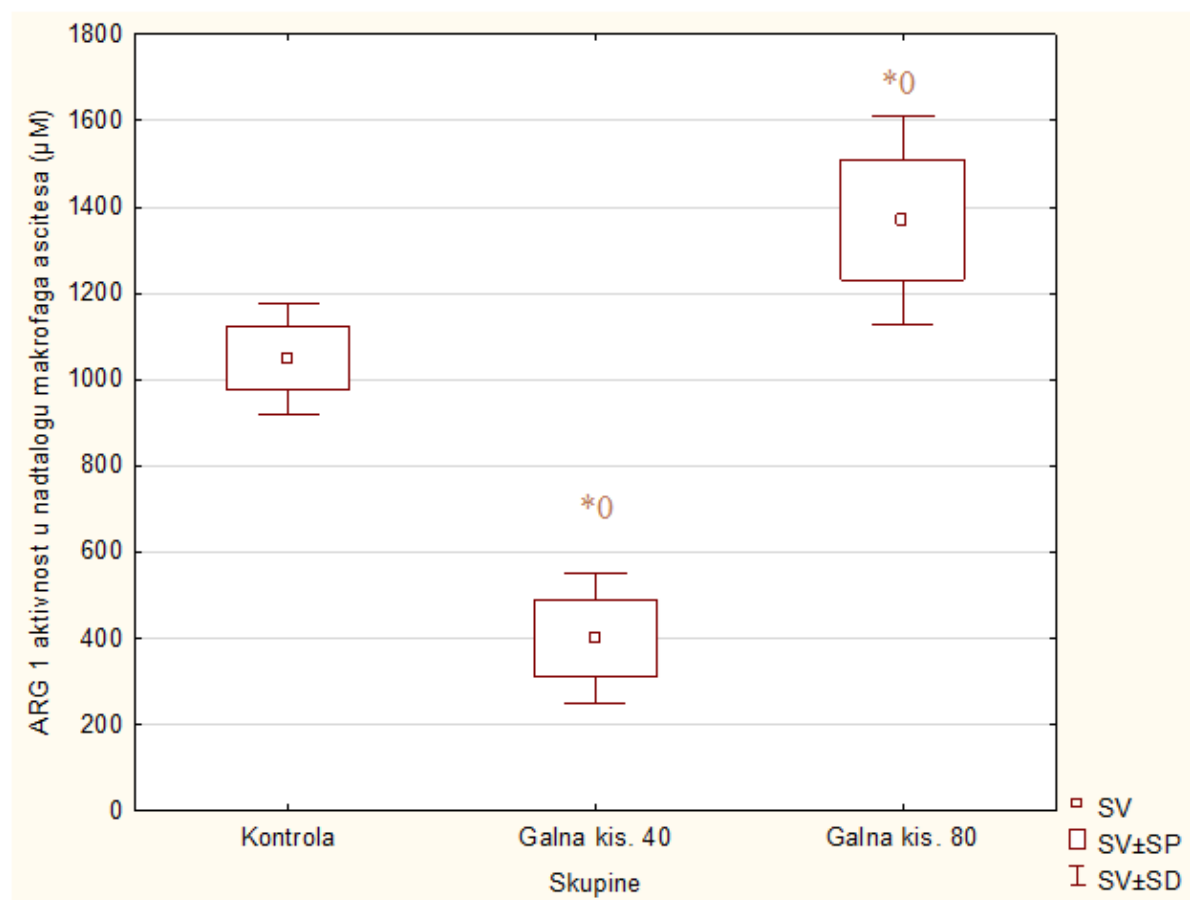
Rezultati određivanja aktivnosti ARG1 u nadatalogu stanica tumora (Slika 19) ukazuju na statistički značajno ($P < 0,05$) smanjenu aktivnost ARG1 kod obrade s GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu. Kod obrade s GA 80 mg/kg nije uočena statistička značajnost u odnosu na kontrolu.



Slika 19. Određivanje aktivnosti ARG 1 u nadatalogu stanica tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) su obrađeni *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu ($*P < 0,05$).

3.7.2. Određivanje aktivnosti ARG 1 u nadtalogu makrofaga ascitesa

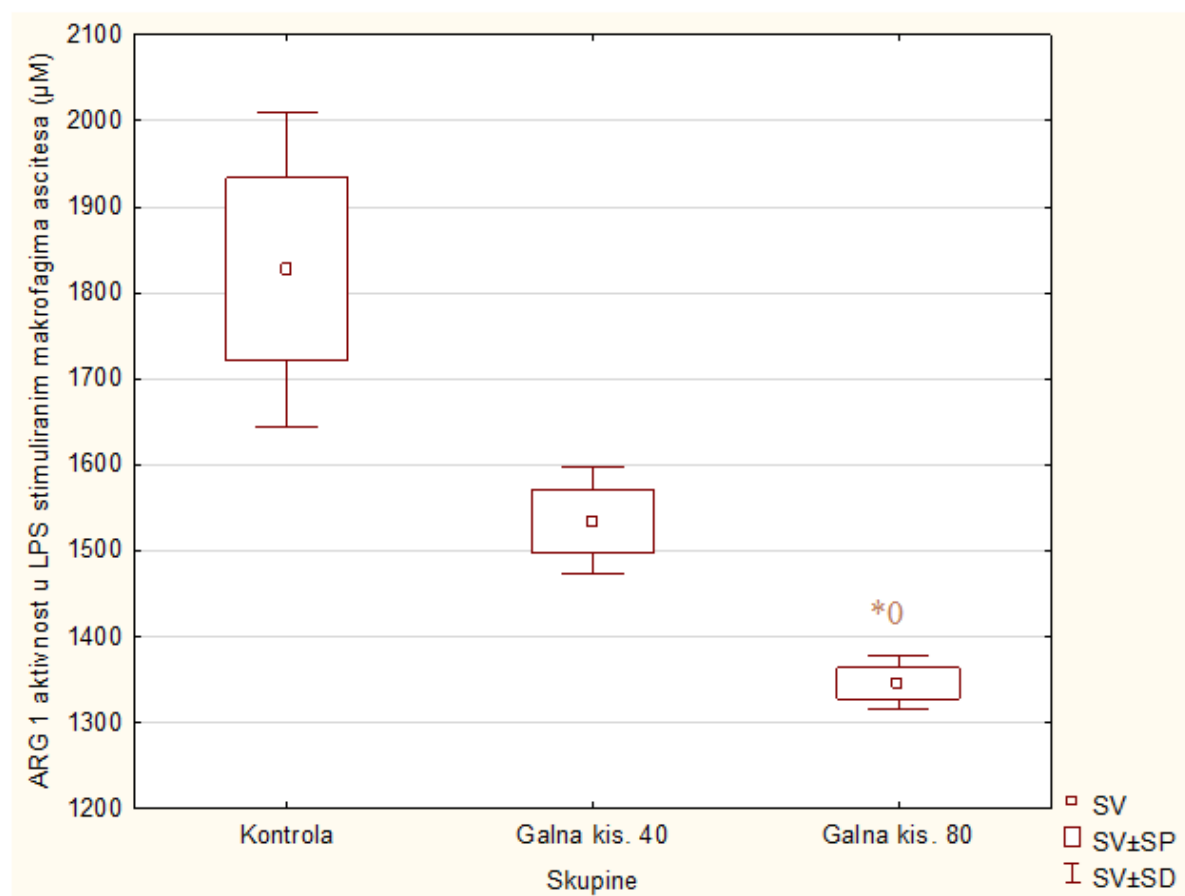
Rezultati određivanja aktivnosti ARG1 u nadtalogu makrofaga ascitesa (Slika 20) ukazuju na statistički značajno ($P < 0,05$) smanjenu aktivnost ARG1 kod obrade s GA 40 mg/kg i statistički značajno ($P < 0,05$) povećanu aktivnost kod obrade s GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu.



Slika 20. Određivanje aktivnosti ARG 1 u nadtalogu makrofaga ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) su obrađeni *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupine u odnosu na kontrolu (* $P < 0,05$).

3.7.3. Određivanje aktivnosti ARG 1 u LPS-om stimuliranim makrofagima ascitesa

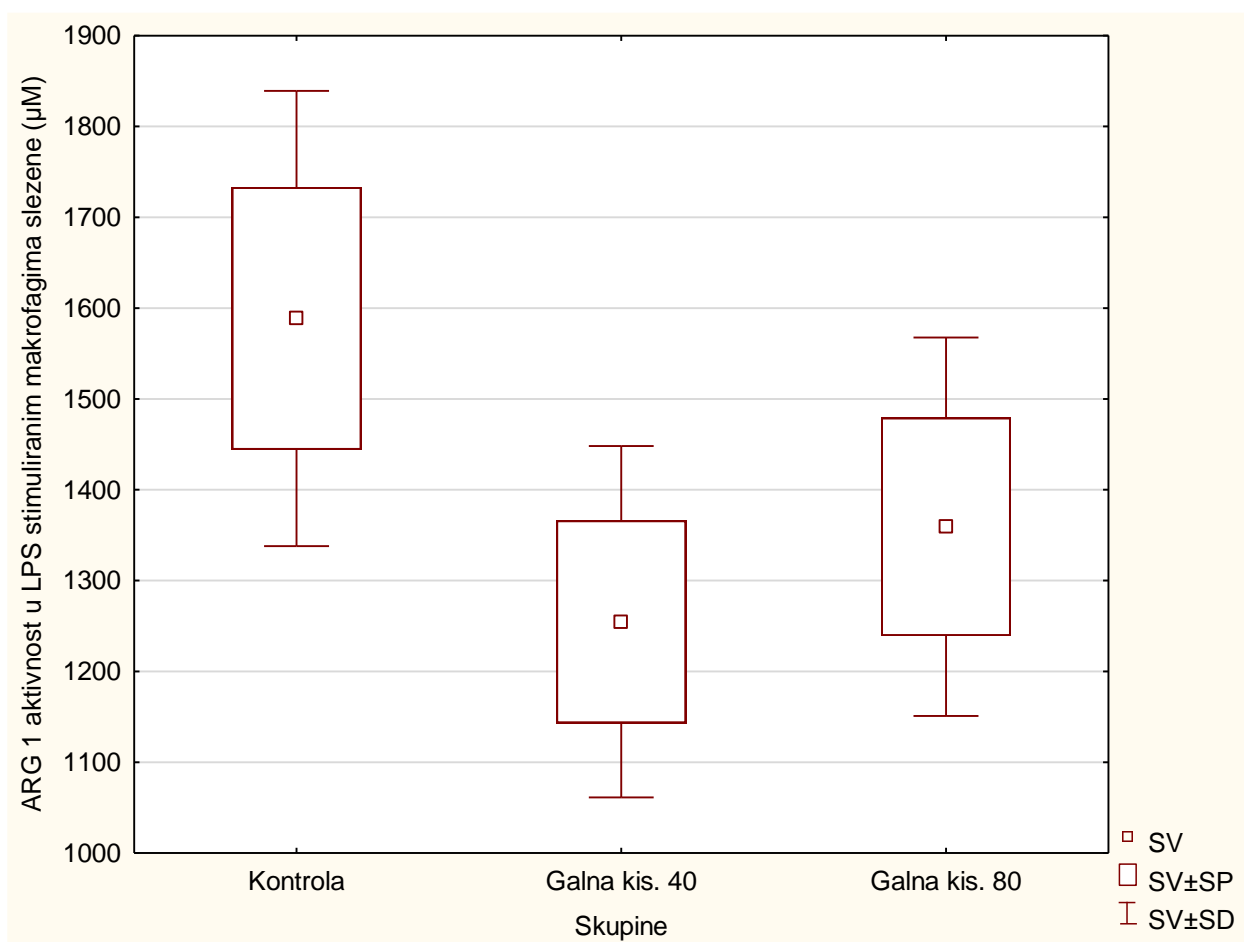
Rezultati određivanja aktivnosti ARG1 u LPS-om stimuliranim makrofagima ascitesa (Slika 21) ukazuju na statistički značajno ($P < 0,05$) smanjenu aktivnost ARG 1 kod obrade s GA 80 mg/kgu odnosu na kontrolu. Kod obrade s GA 40 mg/kg uočena je smanjena aktivnost ARG 1, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu.



Slika 21. Određivanje aktivnosti ARG 1 u LPS-om stimuliranim makrofagima ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) su obrađeni *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu ($*P < 0,05$).

3.7.4. Određivanje koncentracije ARG 1 u LPS-om stimuliranim makrofagima slezene

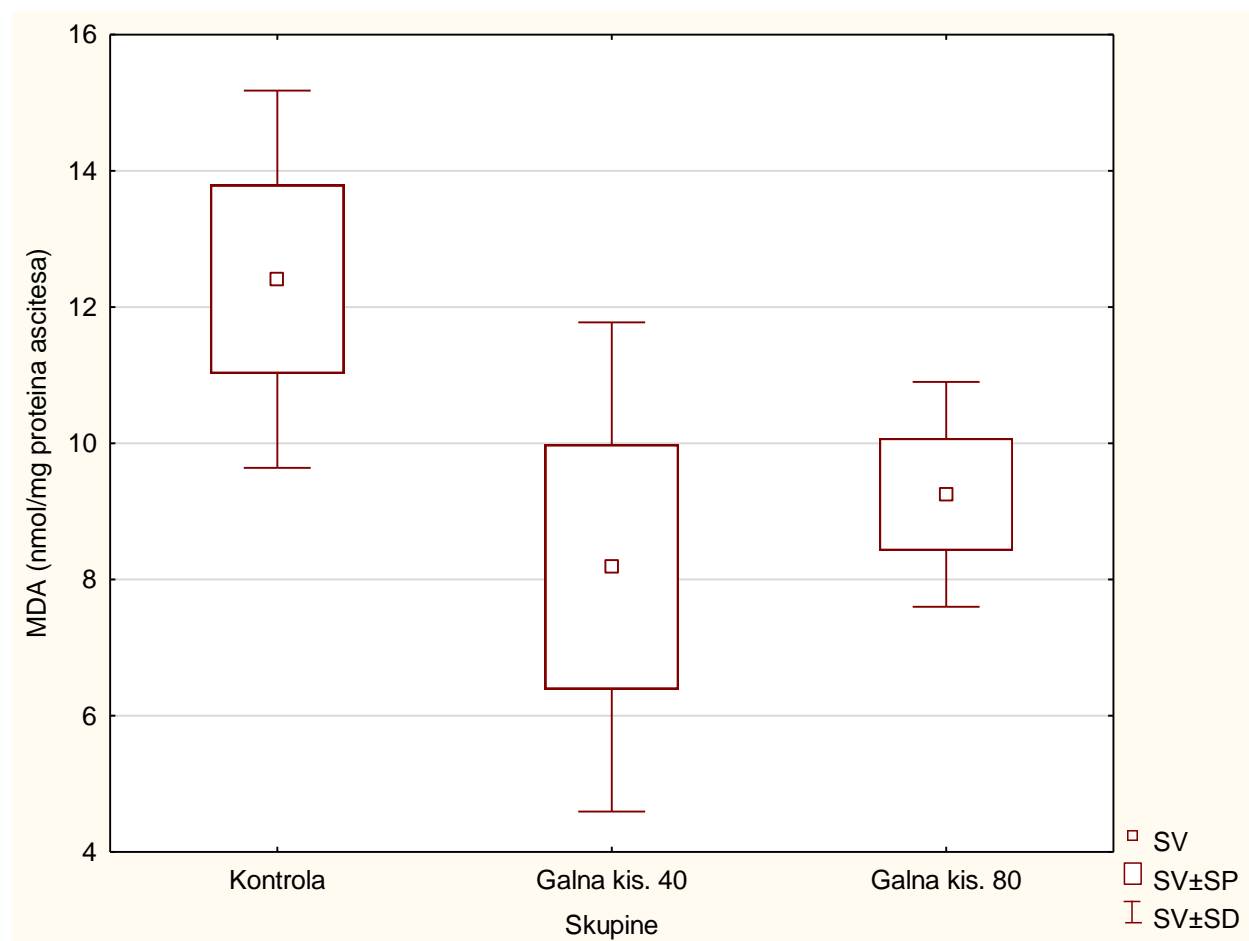
Rezultati određivanja aktivnosti ARG1 u LPS-om stimuliranim makrofagima slezene (Slika 22) ne pokazuju statističku značajnost ($P < 0,05$) kod obrađivanih skupina u odnosu na kontrolu.



Slika 22. Određivanje koncentracije ARG 1 u LPS-om stimuliranim makrofagima slezene miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD.

3.8. Mjerenje količine lipidne peroksidacije (MDA)

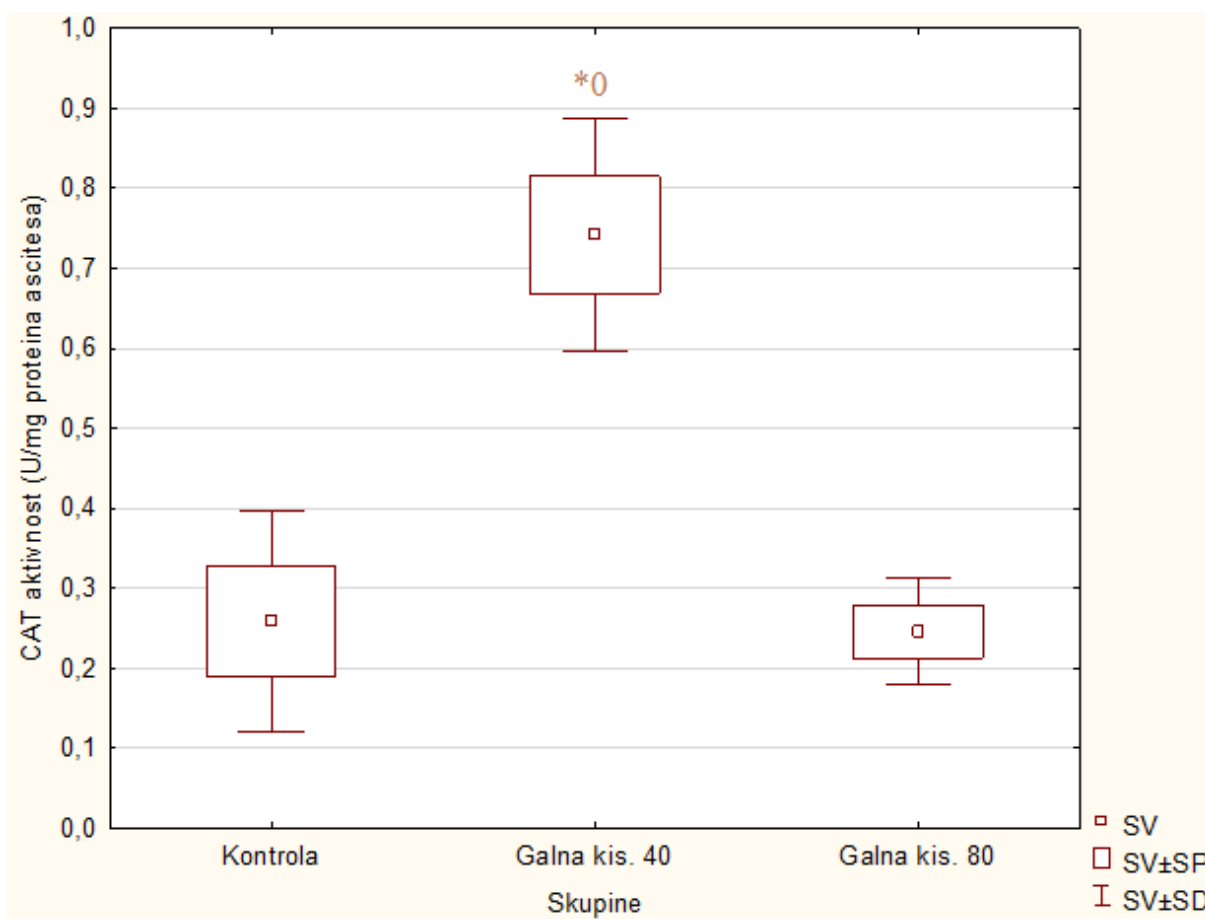
Koncentracija MDA u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom prikazana je na Slici 23. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku ($P > 0,05$) između istraživanih skupina.



Slika 23. Koncentracija MDA u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD.

3.9. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

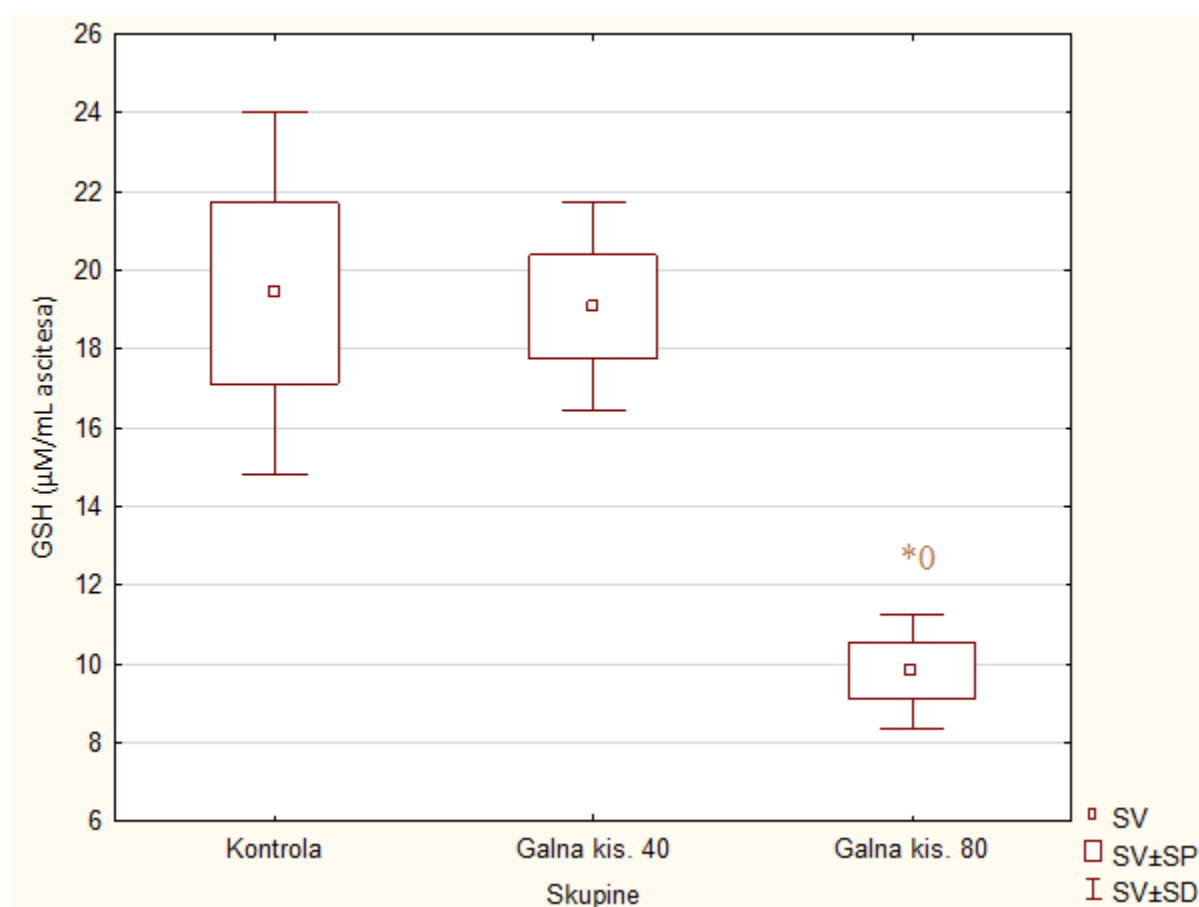
Rezultati određivanja aktivnosti katalaze u uzorku ascitesa (Slika 24) ukazuju na povećanu aktivnost katalaze kod skupine GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu i skupinu GA 80 mg/kg, te statistički značajno povišenu aktivnost katalaze kod skupine GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$).



Slika 24. Koncentracija CAT u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni su *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu ($*P < 0,05$).

3.10. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

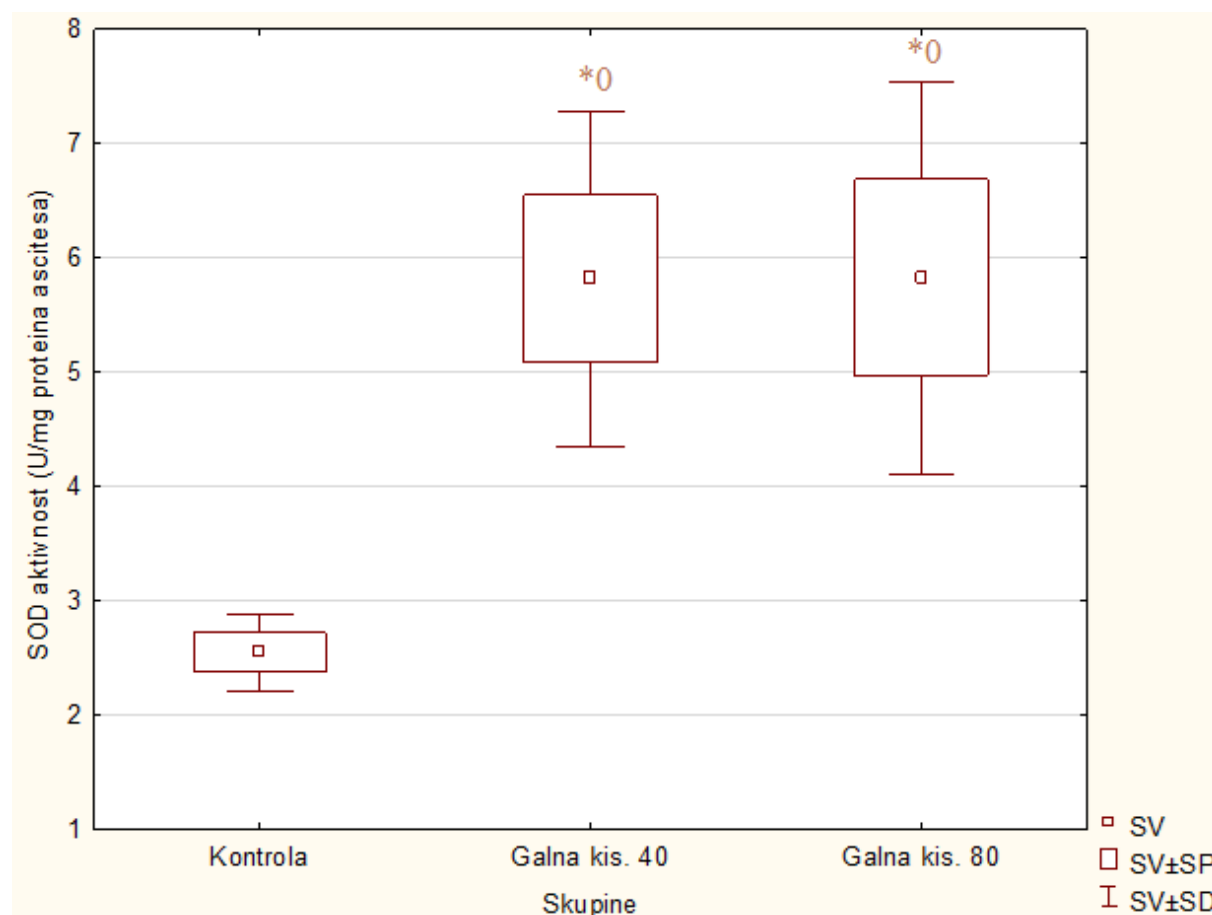
Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa u uzorku ascitesa (Slika 25) ukazuju na povišenu koncentraciju GSH kod kontrole i obrade s GA 40 mg/kg u odnosu na obradu GA 80 mg/kg. Uočena je statistički značajno manja koncentracija GSH ($P < 0,05$) kod obrade s GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu.



Slika 25. Koncentracija GSH u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) su obrađeni *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađene skupine u odnosu na kontrolu ($*P < 0,05$).

3.11. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutase (SOD)

Rezultati određivanja aktivnosti SOD u uzorku ascitesa (Slika 26) ukazuju na statistički značajno veću aktivnost SOD ($P < 0,05$) kod s obrade GA 40 mg/kg i GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu.



Slika 26. Aktivnost SOD u uzorku ascitesa miševa nositelja EAT-a obrađenih s galnom kiselinom. Miševi (N=5) nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) su obrađeni *ip* galnom kiselinom u dozi od 40 i/ili 80 mg/kg nakon 5. dana svaki drugi dan. Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SD. Prikazana je statistička značajnost obrađenih skupina u odnosu na kontrolu (* $P < 0,05$).

4. RASPRAVA

Upala kao lokalizirana reakcija tkiva na infekciju, iritaciju ili neki drugi oblik ozljede, prisutna je u svim stadijima tumora (El- Rafaei i Mady, 2013). Glavnina kroničnih bolesti, uključujući i tumore, na molekularnoj su razini povezane s disreguliranim upalnim odgovorom (Gupta i sur., 2010). Nadalje, produkcija ROS-a i RNS-a posljedica je upala koje dalje vode ka oksidativnim oštećenjima i nitraciji DNA baza, te na taj način povećavajući rizik od nastanka DNA mutacija i razvoja tumorskih bolesti (El- Rafaei i Mady, 2013).

Zbog sve većeg broja dijagnosticiranih zloćudnih bolesti i njihove smrtnosti, te neučinkovitosti postojećih terapija, sve se veći fokus stavlja na pronalazak protutumorskih lijekova i novih metoda liječenja. Naglasak se stavlja na prirodne sastavnice čije se ne-toksično i kemopreventivno djelovanje temelji na više mehanizama koji usporavaju, inhibiraju ili sprječavaju proces karcinogeneze i proliferaciju tumorskih stanica.

Prema Lewandowskom i sur. (2013) polifenoli su skupina fitokemikalija čije su strukturalne razlike odgovorne za njihove pleiotropične aktivnosti, kao i za djelovanje na prevenciju raka; suprimirajući angiogenezu, invaziju tumorskih stanica, metastaziranje i indukciju apoptoze. Naime, danas je poznato oko 8000 polifenolnih molekula od kojih su najznačajnije skupine; fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Bravo, 1998; Escarpa i Gonzalez, 2001).

U radu smo istražili učinkovitost galne kiseline na inhibiciju oksidativnog stresa u miševa, rasta tumora, tumorsku angiogenezu i funkcionalnu sposobnost makrofaga, te makrofagnu polarizaciju.

Galna je kiselina polihidroksifenolična sastavnica široko rasprostranjena u različitim biljkama, voću i hrani, a svoj inhibicijski učinak pokazala je na rastu stanica EAT tumora, brzorastućeg tumora kojeg karakterizira populacija stanica različite osjetljivosti. Protutumorsko djelovanje GA potvrdio je i reducirani broj stanica u trbušnoj šupljini, kao i djelovanje na peritonealnu angiogenezu, gdje je zabilježen broj novonastalih krvnih žila također bio reducirano.

Rezultati dobiveni određivanjem ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini ukazuju na statistički značajno manji ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini kod skupina obrađenih s GA 40 mg/kg i GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu. Pokusna skupina obrađena s GA 40 mg/kg popraćena je povećanim postotkom makrofagnih stanica. Angiogeni potencijal GA *in vivo* pokazuju rezultati dobiveni mjerenjem ukupnog volumena ascitesa u peritonealnoj tekućini i rezultati dobiveni kvantitativnim mjerenjem prožiljenosti. Značajno manji volumen ascitesa kod pokusnih skupina obrađenih s GA 40 mg/kg i GA 80 mg/kg, zabilježen je mjerenjem ukupnog volumena. Osim ukupnog volumena, zabilježena je i smanjena prožiljenost u odnosu na kontrolnu skupinu. Prema Liao i Johnsonu (2007) neprekidna ekspanzija tumorske mase zahtjeva formiranje novih krvnih žila kako bi se rapidno proliferirajuće tumorske stanice opskrbile dovoljnom količinom kisika i metabolite. Mreža krvnih žila u tumorskoj masi razlikuje se od one u normalnim tkivima, pokazujući veliki broj strukturalnih i funkcionalnih abnormalnosti koje vode do iregularnog i sporog krvnog protoka, te na taj način smanjujući i tumorskim stanicama opskrbu kisikom i nutrijentima, što za posljedicu ima pojavu hipoksičnih u anoksičnih aresta (Vaupel, 2004). Genetski i epigenetski čimbenici, te ROS i oslabljeni imunosni nadzor doprinose razvoju i širenju tumora.

Monociti i makrofagi predstavljaju prvu staničnu liniju obrane organizma od mikroba. Monociti-makrofagi nastaju u koštanoj srži od zajedničke mijelopoetske prastanice koja se usmjerava u prastanicu monocitne loze od koje dalje nastaju promonociti, a oni dalje u sazrijevaju monocite i ulaze u krv.

Monociti u krvi borave 1- 4 dana, a potom odlaze u tkiva, gdje postaju tkivni makrofagi (Andreis i sur., 2010). Makrofagi se kao slobodne i fiksne stanice nalaze u različitim tkivima i seroznim šupljinama. Slobodnih makrofaga ima mnogo u peritonealnoj i pleuralnoj šupljini, plućima, koštanoj srži, i nešto manje, u slezeni i limfnim čvorovima, dok se fiksni makrofagi nalaze u različitim tkivima (Andreis i sur., 2010). Osim što reagiraju na kemijske tvari iz okoliša, makrofagi izlučuju i različite tvari u okoliš, kao što su proupalni citokini, interleukini, kemokini i sl. (Andreis i sur., 2010).

Naime, aktivirani makrofagi mogu postati citotoksični i tada ih karakterizira bolja pokretljivost, prijanjanje na podlogu, sposobnost fagocitiranja i dr., zbog čega postaju citotoksični za tumorske stanice. Tijekom napredovanja tumora, tumor aktivno privlači (regrutira) monocite i makrofage iz cirkulacije u tumor, gdje makrofagi u nazočnosti raznih mikrookolišnih signalnih molekula tumora i stromalnih stanica mijenjaju mikrookoliš tumora i ubrzavaju njegov rast (Cooper i Hausman, 2010). Osim fenotipskih promjena, makrofagi mijenjaju svoju funkciju; dolazi do polarizacije makrofaga od klasičnih M1 u alternativne M2 makrofage. M1 makrofagi uključeni su u upalni odgovor, uništavanje patogena, i antitumorsku imunost. Nasuprot tome, M2 makrofagi utječu na protuupalni odgovor, zacjeljivanje rana i imaju prokarcinogene značajke.

Istražili smo funkcionalnu sposobnost makrofaga i njihovu ulogu u stvaranju aktivnih molekula poput NO i arginaze 1. Naime, prema El- Rafaei i Madyju (2013) NO je povezan s upalnom reakcijom, a njegova velika proizvodnja patogena je za tkivo, jer kao reaktivni radikal direktno uništava funkcije zdravog tkiva. S obzirom na to da NO u visokim dozama ima inhibicijski učinak na rast tumora, paradoks leži u tome da pri nižim koncentracijama NO na rast tumora djeluje stimulirajuće.

Arginaza (engl. *L-arginine amidinohydrolase*, L-arginin amidinohidrolaza) je enzim koji sudjeluje u posljednoj reakciji metaboličkog ciklusa ureje (Slika 7), gdje katalizira pretvorbu aminokiseline L-arginina u L-ornitin i ureju ($\text{L-arginin} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{L-ornitin} + \text{ureja}$). Postoje dvije izoforme ovog enzima, jetrena arginaza-1 i arginaza-2 prisutna u bubrezima, mozgu, prostati, tankom crijevu i mliječnim žlijezdama (Iyer i sur., 2002). Zanimljivo je da se inducibilna dušik oksid sintaza (iNOS) i arginaza natječu za zajednički supstrat, aminokiselinu L-arginin (Campbell i sur., 2013). M1-makrofagi potiču iNOS da katabolizira L-arginin u NO (citostatični i citolitički učinak) i citrulin, dok su M2 makrofagi karakteristični po visokoj ekspresiji arginaze-1 (Arg-1), citosolnog enzima koji katalizira alternativni metabolički put L-arginina u ornitin i poliamine, koji su prekursori u sintezi kolagena i stanične proliferacije (Corraliza i sur., 1994; Rodríguez i Ochoa, 2008). Prema tome, povećana regulacija Arg uglavnom je prisutna u M2 makrofagima koji luče proangiogene čimbenike poput VEGF-a, MMPs-2 i MMPs-9 te posjeduju protuupalno svojstvo popravka oštećenog tkiva, dok je iNOS više prisutna u M1 makrofagima koji luče proupalne citokine i imaju pojačano antimikrobno djelovanje.

Matriks metaloproteinaze (MMPs), osobito MMP-2 i MMP-9 su glavni enzimi koji sudjeluju u degradaciji izvanstaničnog matriksa, koji predstavlja prirodnu barijeru invaziji tumora i metastaza te je njihova pretjerana ekspresija uočena kod različitih malignih oboljenja (McCawley i Matrisian, 2000; Yang i sur., 2003).

U tom smislu, svi čimbenici koji kontroliraju brzinu toka L-arginina između arginaze i iNOS mogu biti važni u regulaciji staničnog rasta kako ne bi došlo do pojave kroničnog oboljenja. Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički smanjenu aktivnost NO kod pokusnih skupina obrađenih s GA 40 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je peritonealnim makrofagima povećana razina NO. Obzirom na dobivene rezultate, možemo zaključiti da GA može aktivirati makrofage i povećati njihov citotoksični učinak kroz povećanje proizvodnje NO, te na taj način spriječiti rast tumora i angiogenezu.

Potvrda da je spriječena polarizacija makrofaga u M2 makrofage iz koje su odvedeni i tumoru pridruženi makrofagi (engl. *tumour-associated macrophages*, TAMs) koji pospješuju rast tumora i angiogenezu, svakako je snižena vrijednost arginaze 1. Temeljem dobivenih rezultata razvidno je da obrda miševa s GA spriječava polarizaciju makrofaga, rast tumora i angiogenezu.

Nadalje, slobodni radikali i derivati radikala, kao i neradikalne čestice, u visokim koncentracijama predstavljaju opasnost za organizam i glavne stanične sastavnice, dok u umjerenim koncentracijama imaju ulogu regulatornih posrednika staničnog signalnog puta (Dröge, 2002). U velikim koncentracijama ROS uzrokuju promjene na proteinima, točnije oksidativne promjene koje mogu dovesti do promjena u funkcioniranju proteina, kemijskoj fragmentaciji ili povećanoj preosjetljivosti na proteolitički utjecaj (Dröge, 2002).

Prema Pham-Huy i sur. (2008) glavni enzimski antioksidansi uključeni u proces neutralizacije reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx) i glutation reduktaza (GRx).

Rezultati dobiveni mjerenjem razine GSH u ascitesu pokusnih skupina pokazuju povišene koncentracije u kontrolnoj skupini i skupini obrađenoj s GA 40 mg/kg, dok je manja razina GSH zabilježena kod skupine obrađene s GA 80 mg/kg u odnosu na kontrolu. Ovakve rezultate možemo pripisati heterogenosti stanica u EAT tumoru.

Nadalje, pokusne skupine obrađene s GA 40 mg/kg pokazuju povećanu razinu aktivnosti i superoksid dizmutaze i katalaze, dok pokusne skupine obrađene s GA 80 mg/kg ne pokazuju statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.

Temeljem svih rezultata možemo zaključiti da GA kiselina djeluje inhibicijski na stanice EAT tumora, te da se model angiogeneze prouzročen *ip* unosom Ehrlichova ascitesnog tumora (EAT) u Swiss albino miševa pokazao izuzetno dobrim za utvrđivanje korisnih svojstava GA na tumorske stanice.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati dobiveni provedenim istraživanjem ukazuju na sljedeće:

1. GA statistički značajno smanjuje broj tumorskih stanica EAT u trbušnoj šupljini miševa nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora.
2. GA potvrdila je svoje antitumorsko djelovanje kroz pojačanu aktivnost M1 makrofaga te supresiju angiogeneze.
3. Aktivirani makrofagi pokazali su citotoksični učinak na tumorske stanice EAT.
4. Temelj za citotoksičnost makrofaga je povećana proizvodnja NO i smanjena razina arginaze 1.
5. Smanjena razina MDA i povišena razina GSH ukazuje na antioksidativni i zaštitni učinak GA na zdrave stanice.
6. Model angiogeneze prouzročen *ip* unosom stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u Swiss albino miševe idealan je model za proučavanje različitih bioloških aktivnosti GA, uključujući antitumorsku.

6. LITERATURA

1. Adair T. H., Montani J. P. (2010): Angiogenesis. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
2. Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
3. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinivić-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjic D. (2010): Imunologija, 7. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
4. Biesalski H. K. (2007): Polyphenols and inflammation: basic interactions. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 10(6):724- 728.
5. Bravo L. (1998): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. 56:317- 333.
6. Campbell L., Saville C. R., Murray P. J., Cruickshank S. M., Hardman M. J. (2013): Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. J. Invest. Derm. 133: 246 1-2470.
7. Chen H. M., Wu Y. C., Chia Y. C., Chang F. R., Hsu H. K., Hsieh Y. C., Chen C. C., Yuan S. S. (2009): Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, contains a ROS-mediated anti- cancer activity in human prostate cancer cells. Cancer Lett. 286:161-171.
8. Chinh Chung D., Thanh Long L., Nghia Son H., Tri Bao L., Minh Si D., Dong le V. (2015): Downregulation of vascular endothelial growth factor enhances chemosensitivity by induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. Cell J. 17(2):273- 87.
9. Clapp C., Thebault S., Jeziorski M. C., Martinez De La Escalera G. (2009): Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. Physiol. Rev. 89 (4): 1177-1215.
10. Cooper G. M., Hausman R. E. (2010): Stanica, 5. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
11. Corraliza I. M., Campo M. L., Soler G., Modolell M. (1994): Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. J. Immunol. Meth. 174: 231-235.
12. Dedić Plavetić N., Letilović T., Vrbanc D. (2003): Uloga angiogeneze u rastu i progresiji tumora. Liječ. Vjesn. 125: 260-265.
13. Droge W. (2002): Free radicals in the physiological control control of cell function. Physiol. Rev. 82(1):47-95.

- 14.** El- Refaei M. F., Mady E. A. (2013): Regulation of apoptosis, invasion and angiogenesis of tumor cells by caffeic acid phenethyl ester. *Carcinogenesis*, Dr. Kathryn Tonissen (Ed.), In Tech.
- 15.** Escarpa A., Gonzalez M. C. (2001): An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31:57-139.
- 16.** Gupta S. C., Kim J. H., Prasad S., Aggarwal B. B. (2010): Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev.* 29(3):405- 434.
- 17.** Ho H. H., Chang C. S., Ho W. C., Liao S. Y., Wu C. H., Wang C. J. (2010): Anti- metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF- kappaB activity and downregulation of PI3K/ AKT/ small GTPase signals. *Food Chem. Toxicol.* 48(8- 9):2508-16.
- 18.** Hudiček Martiničić G., Kušan Jukić M., Salihagić Kadić A. (2004): Dušikov oksid- važna signalna molekula u normalnoj i patološkoj trudnoći. *Liječ. Vjesn.* 126: 80-85.
- 19.** Iyer R. K., Yoo P. K., Kem R. M., Rozengurt N., Tsoa R., O'Brien W. E., Yu EL, Grody W. W., Cederbaum S. D. (2002): Mouse model for human arginase deficiency. *Mol. Cell. Biol.* 22 (13): 4491-4498.
- 20.** Krock B. L., Skuli N., Simon M. C. (2011): Hypoxia- induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2(12):1117- 33.
- 21.** Lee S. L., Rouhi P., Dahl Jensen L., Zhang D., Ji H., Hauptmann G., Ingham P., Cao Y. (2009): Hypoxia- induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106 (46):19485-90.
- 22.** Lešin J., Zlopaša G., Plavec A., Aleksandrova Stanojević A., Vujić G. (2008): Angiogeneza u malignih tumora. *Medicus.* 17 (1):143-148.
- 23.** Lewandowska U., Szewczyk K., Owczarek K., Hrabec Z., Podśędek A., Sosnowska D., Hrabec E. (2013): Procyanidins from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds inhibit invasiveness of breast cancer cells and modulate the expression of selected genes involved in angiogenesis, metastasis, and apoptosis. *Nutr. Cancer* 65(8):1219-31.
- 24.** Liao D., Johnson R. S. (2007): Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26:281-290.

- 25.** Locatelli C., Filippin- Monteiro F. B., Creczynski- Pasa T. B. (2013): Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 60:233-239.
- 26.** McCawley L. J., Matrisian L. M. (2000): Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol. Med. Today* 6 (4): 149-156.
- 27.** Pham- Huy L. A., He H., Pham- Huy C. (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4(2):89- 96.
- 28.** Rodriguez P. C., Ochoa A. C. (2008): Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* 222: 180-191.
- 29.** Štefan L., Tepšić T., Zaviđić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina* 43: 84-93.
- 30.** Vaupel P. (2004): The Role of hypoxia- induced factors in tumor progression. *Oncologist*. 9 Suppl 5:10-7.
- 31.** Xia C., Meng Q., Liu L. Z., Rojanasakul Y., Wang X. R., Jiang B. H. (2007): Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 67 (22):10823-30.
- 32.** Yang J. M., Xu Z., Wu H., Zhu H., Wu X., Hait W. N. (2003): Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 1: 420-427.
- 33.** Yoon J. H., Baek S. J. (2005): Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.* 46 (5): 585-596.
- 34.** You B. R., Moon H. J., Han Y. H., Park W. H. (2010): Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food Chem. Toxicol.* 48(5):1334-40.

SLIKE S INTERNETA:

35. <http://biomedfrontiers.org/infection-2014-5-16/>, pristupljeno 26.08.2016

36. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0d/Gallic_acid.svg/300px-Gallic_acid.svg.png, pristupljeno 26.08.2016.

37. www.promega.com , pristupljeno 26.08.2016.

38. www.supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/9203 , pristupljeno 26.08.2016.

39. http://medlib.mef.hr/217/1/Gordana_Pavlisa_doktorska_disertacija.pdf , pristupljeno 26.08.2016

7. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Josipa Dragun

Datum rođenja: 02.02.1993.

Adresa: B. J. Jelačića 140, 32 100 Vinkovci

OBRAZOVANJE:

2014.- 2016. Prirodoslovno- matematički fakultet, Biološki odsjek, diplomski studij
Eksperimentalna biologija, smjer: Fiziologija i imunobiologija

2011.- 2014. Odjel za biologiju, preddiplomski studij, Sveučilište J. J. Strossmayera u
Osijeku

2007.- 2011. Gimnazija M. A. Reljković, Vinkovci

RADNO ISKUSTVO:

Laboratorijska stručna praksa – Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju (pod
vodstvom prof. dr. sc. Nada Oršolić)

Popularizacija znanosti- 2015., član tima edukacijskih radionica za osnovne i srednje škole

Tjedan mozga – 2014., predavač na Tjednu mozga u Osijeku

Festival znanosti- 2014., član tima edukacijskih radionica za osnovne i srednje škole na
Odjelu za biologiju u Osijeku

Turistički vodič – 2011.- 2014., Osijek

